



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

SEDE CONCEPCIÓN

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCER DE
UN APTASENSOR BASADO EN AUNPS Y APTÁMERO
ESPECÍFICO DE CLORPIRIFÓS ENTRE CLORPIRIFÓS Y
CLORPIRIFÓS OXÓN**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y
Bioingeniería

Profesor tutor: Dr. Víctor Díaz García

Profesor co-tutor: Dra. Karla Pozo

Estudiante: **Mariett Alejandra Torres Gutiérrez**

© (Mariett Torres Gutiérrez). Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.

Concepción, Chile

2022

CALIFICACIÓN

En _____, el _____ de _____ de _____, los abajo firmantes dejan _____ constancia que _____ estudiante _____, de la carrera _____ ha aprobado la tesis para optar al título de _____ con una nota de _____.

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de magíster a todas las personas que me han acompañado en este nuevo desafío académico y gracias totales por sus buenas energías, comprensión, apoyo intelectual y emocional.

Mi hija, familia y amigos incondicionales....

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre y hermano por su eterno apoyo para continuar con mi formación académica.

A mi amada hija Florencia por su comprensión y soporte motivacional.

A mis amigas, Esthefany, Camila y Bernardita por su apoyo inquebrantable por siempre tener el tiempo para ayudarme en el ámbito profesional y personal.

Al padre de Florencia y su familia por su ayuda, comprensión y colaboración con el cuidado de mi hija en tiempos de mucho trabajo.

A Dra. Karla Pozo por su apoyo, motivación y preocupación, además de siempre darse un tiempo para aconsejarme.

A Dr. Víctor Díaz por su apoyo académico como profesor guía, también por su apoyo emocional, consejos y anécdotas.

Al proyecto Fondecyt postdoctoral N°3190734 para la adquisición de estándares analíticos.

Al proyecto Fondecyt 1161673 que dirige la Dra. Karla Pozo por su apoyo financiero, para la realización de esta tesis.

A todas las personas que me conocen y que aportaron de una u otra manera en mi vida.

"la posibilidad de innovar siempre está ahí si uno está dispuesto a reflexionar, a soltar las certidumbres de donde está parado y a preguntarse si quiere estar donde está".

Humberto Maturana

RESUMEN

El clorpirifós es el segundo pesticida más detectado en productos alimentarios y en el agua lo que ha motivado una exponencial preocupación por concepto de pérdida de biodiversidad, riesgos viables para la salud de las personas y otros organismos no objetivos.

Una de las acciones relevantes para el manejo de este contaminante es la detección temprana, pero esta presenta varios desafíos asociados a la movilidad del plaguicida, factores naturales como la biodegradación, la fotodegradación y la hidrólisis química disminuyen su persistencia y ecotoxicidad en el medio ambiente y los desafíos asociados a su detección analítica como los procedimientos de muestreos en terrenos, contenedores para tomas de muestras, almacenamientos adecuados, pretratamientos de la muestra, mayores volúmenes de solvente y costos asociados a personal en terreno y de análisis de residuos basados en cromatografía de gases y cromatografía líquida. Para superar los inconvenientes de los métodos tradicionales, se ha trabajado en el desarrollo de nanobiosensores, que permitirían la detección de contaminantes en terreno, favoreciendo el seguimiento de la descarga de contaminantes al medioambiente. Pero, clorpirifós se degrada en el medio ambiente, por lo que determinar si los nanobiosensores desarrollados para clorpirifós son capaces de detectar los productos de degradación de CP, es relevante para establecer las reales capacidades de detección de estos dispositivos.

Por estos motivos, este trabajo aborda el desarrollo de un nanoaptasensor (NAS) basado en nanopartículas de oro (AuNPs) unidas a aptámero específico para clorpirifós, estandarizando las condiciones de funcionamiento del NAS, para posteriormente, determinar la capacidad de este NAS para detectar clorpirifós- oxon, uno de los primeros metabolitos producidos por la degradación de clorpirifós. Los resultados mostraron que trabajar con una proporción molar de AuNPs: aptámero de 1:20, bajo condiciones de pH a 6,5 y 1,5 M de NaCl como agente revelador permitieron detectar un mínimo de 60 ppb de clorpirifós en agua. Con estos resultados, se proyecta avanzar en desafiar al NAS para determinar su capacidad de detección de clorpirifós-oxon.

Palabras clave: nanoaptasensor, contaminación hídrica, Clorpirifós.

ABSTRACT

Chlorpyrifos is the second most detected pesticide in food products and in water, which has caused an exponential concern due to the loss of biodiversity, viable risks to the health of people and other non-target organisms.

One of the relevant actions for the management of this contaminant is early detection, but this presents several challenges associated with the mobility of the pesticide, natural factors such as biodegradation, photodegradation and chemical hydrolysis that reduce its persistence and ecotoxicity in the environment and the challenges associated with its analytical detection such as field sampling procedures, sampling containers, adequate storage, sample pretreatment, higher volumes of solvent and costs associated with field personnel and gas chromatography-based residue analysis and liquid chromatography. To overcome the drawbacks of traditional methods, work has been done on the development of nanobiosensors, which would allow the detection of pollutants in the field, favoring the monitoring of the discharge of pollutants into the environment. However, chlorpyrifos degrades in the environment, so determining whether the nanobiosensors developed for chlorpyrifos are capable of detecting CP degradation products is relevant to establish the real detection capabilities of these devices.

For these reasons, this work deals with the development of a nanoaptasensor (NAS) based on gold nanoparticles (AuNPs) linked to a specific aptamer for chlorpyrifos, standardizing the operating conditions of the NAS, to later determine the capacity of this NAS to detect chlorpyrifos. - oxon, one of the first metabolites produced by the degradation of chlorpyrifos. The results showed that working with a molar ratio of AuNPs: aptamer of 1:20, under conditions of pH at 6.5 and 1.5 M NaCl as revealing agent, allowed detecting a minimum of 60 ppb of chlorpyrifos in water. With these results, it is planned to move forward in challenging the NAS to determine its ability to detect chlorpyrifos-oxon.

Keywords: nanoaptasensor, water pollution, Chlorpyrifos

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS	x
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 2.....	5
ESTADO DEL ARTE	5
Contaminación por Clorpirifós	5
Degradación del Clorpirifós	6
Efectos del Clorpirifós sobre la salud y medio ambiente	8
¿Que son los biosensores?	10
Biosensores para la detección de Clorpirifós.....	11
Nanotecnología	13
Nanomateriales	14
Nanomateriales metálicos	15
Nanopartículas de Oro.....	16
Importancia y aplicaciones de los aptámeros	18
Modificaciones químicas de los aptámeros	19
Aptasensor colorimétrico	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	23
Objetivos específicos.....	23
CAPITULO 3.....	24
MATERIALES Y METODOLOGÍAS.....	24
1. Evaluación de la degradación de Clorpirifós en agua.	24
2. Síntesis y Caracterización AuNPs.....	25
Determinación de la concentración de AuNPs	26

3. Funcionalización de AuNPs	27
4. Determinación de parámetros analíticos para el aptasensor específico para la detección cuantitativa de clorpirifós.	28
5. Análisis estadístico.....	30
Capítulo 4	31
RESULTADOS	31
1. Evaluación de la degradación del Clorpirifós en agua bajo condiciones experimentales de laboratorio.	31
Sintetizar y caracterizar Nanoaptasensor (NAS) para la detección de Clorpirifós.....	34
1. Síntesis de AuNPs	34
Determinación de parámetros analíticos de funcionalización de AuNPs.	35
1. Determinación de biosensores de diferente proporcionalidad nmolar de AuNPs/ aptámero para la detección de clorpirifós	35
2. Determinación de los parámetros de funcionamiento del aptasensor: NaCl.....	40
3. Determinación de los parámetros de funcionamiento del aptasensor: pH 45	
Evaluación del reconocimiento de clorpirifós por el aptámero.....	46
Capítulo 5	48
DISCUSIÓN.....	48
Parámetros analíticos de funcionalización de AuNPs.....	52
Reconocimiento de clorpirifós por el aptámero.....	54
Capítulo 6	55
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES.....	56
Perspectivas futuras	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
1. Anexos	69
Evaluación de la vida media de los Biosensores	70
Publicación científica	72

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta propuesta para la degradación aeróbica y anaeróbica para Clorpirifós.....	7
Figura 2 Destino ambiental del plaguicida Clorpirifós en el medio ambiente.	10
Figura 3 Esquema básico de los componentes de un Biosensor.....	11
Figura 4 Principales Biosensores y materiales biológicos para la detección de compuestos organofosforados- Clorpirifós.	13
Figura 5 Aptámero específico para Clorpirifós.	20
Figura 6 Representación de un aptasensor colorimétrico para la detección de Clorpirifós.....	21
Figura 7. Espectro de absorbancia de clorpirifós. HPLC/DAD.....	32
Figura 8. Cromatograma de absorción para Clorpirifós.	33
Figura 9. Cromatograma de absorción para Clorpirifós incubados 21 días.	34
Figura 10. Espectro de absorción de solución de AuNPs.	35
Figura 11. Espectro de Absorbancia de soluciones de AuNPs funcionalizadas con 2 proporciones de aptámeros.....	36
Figura 12. Determinación de Clorpirifós utilizando NAS 1:10..	37
Figura 13 Determinación de agregación de NAS 1:10. NAS	38
Figura 14. Determinación de Clorpirifós utilizando NAS 1:20.	39
Figura 15. Determinación de agregación de NAS 1:20.....	39
Figura 16. Determinación de efecto de la concentración del revelador en la capacidad de detección de NAS 1:10.....	41
Figura 17. Representación de la relación A620/A520 de las NAS 1:10.	42
Figura 18. Determinación de efecto de la concentración del NaCl en la capacidad de detección de NAS 1:20.....	43
Figura 19. Determinación de la relación A620/A520 de las NAS 1:20.	44
Figura 20. Efecto del pH en la detección de clorpirifós por el NAS 1:20. s. .	45
Figura 21. Detección colorimétrica de Clorpirifós en agua basada en la relación A620/A520.....	47

Figura 22. Espectro de absorbancia para el aptasensor 1:10 posterior a 21 días desde su preparación.....	71
Figura 23. Espectro de absorbancia para el aptasensor 1:20 posterior a 21 días desde su preparación.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.Descripción general de las regulaciones ambientales para Clorpirifós.	6
Tabla 2 Revisión bibliográfica de algunas concentraciones detectadas de Clorpirifós en distintas matrices ambientales bióticas y abióticas.	9
Tabla 3. Reactivos, equipos y software para la evaluación de la degradación de Clorpirifós en agua.	24
Tabla 4 Reactivos, equipos y software para síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs).	25
Tabla 5 Reactivos, equipos y software para la determinación de parámetros analíticos para el aptasensor específico de detección cuantitativa del clorpirifós.	28
Tabla 6 Revisión de elementos de reconocimiento biológico para Clorpirifós	49
Tabla 7. Comparación de técnicas para la detección de clorpirifós en matrices ambientales.....	51
Tabla 8 Tabla. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifós	69

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Dentro de las numerosas sustancias orgánicas que se conocen como contaminantes del agua. Los agroquímicos tóxicos como los plaguicidas son una fuente importante de contaminación tanto para aguas subterráneas como superficiales, si bien, los plaguicidas juegan un papel positivo para la economía de un país, su uso generalizado ha deteriorado la biodiversidad y en consecuencia impactos negativos en la calidad de los ecosistemas hídricos (Liu *et al.*, 2010; Vörösmarty *et al.*, 2010; Pimm *et al.*, 2014; Bala *et al.*, 2017).

El destino de los plaguicidas en el ambiente se rige por los procesos de retención, transporte, disipación, degradación y sus interacciones en el medio ambiente, así también por las propiedades fisicoquímicas, solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de partición suelo-agua (K_{oc}), vida media, coeficiente octanol-agua (K_{ow}) que simula el carácter hidrófobo de una sustancia que permite las estimaciones de concentración en los compartimientos ambientales (Cui *et al.*, 2020). Con respecto al manejo de plaguicidas Citartan *et al.*, 2019 advierte que aproximadamente 95% de los plaguicidas llegan a un destino que, no es necesariamente, la especie objetivo, lo que podría provocar la contaminación del agua y productos alimenticios.

Para el control y manejo apropiado de plaguicidas, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas (ONU), especializado en gestionar medidas de prevención a nivel mundial, y la Unión Europea (UE), han adoptado algunas políticas para permitir el manejo de plaguicidas y establecen niveles máximos de residuos (LMR) en productos agrícolas, alimentos y cuerpos de agua (Zhang *et al.*, 2014). Los instrumentos legislativos vinculantes que regulan el uso de plaguicidas son: i) El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). ii) El Convenio de Róterdam sobre el procedimiento de aprobación a ciertos

plaguicidas y otros productos químicos sobre el comercio internacional de plaguicidas y productos peligrosos iii) El Protocolo de Montreal sobre sustancias que agotan la capa de ozono. iv) Los Convenios de Basilea y Bamako sobre control de movimientos transfronterizos de residuos peligrosos y su eliminación. El clorpirifós al ser un plaguicida se regula su uso, transporte y concentración en matrices ambientales, así también, obtiene una importancia ambiental, por su presencia omnipresente en todas las matrices ambientales a pesar de que en la actualidad no se encuentra clasificado como un compuesto orgánico persistente (COPs). La permanencia en el medio ambiente se atribuye a sus características fisicoquímicas y a la disminución de la capacidad asimilativa del medio ambiente para degradar al clorpirifós.

La presencia de Clorpirifós en el medio ambiente es particularmente peligrosa por su toxicidad y riesgo que representa para el medio ambiente y la salud humana, porque principalmente actúa interfiriendo la colinesterasa, enzima esencial para el buen funcionamiento del sistema nervioso en organismos y sistema nervioso de humanos (Liu *et al.*, 2019), así mismo, su presencia incluye sus productos de conversión y sus metabolitos en alimentos, en cuerpos de agua, en aire y suelos (Bala *et al.*, 2017).

El escenario global de contaminación por Clorpirifós en diferentes territorios del mundo se fundamenta en numerosos estudios de la calidad del agua, suelos y aire, por ejemplo, en Estados Unidos, India, España, China y Chile que han reportaron concentraciones excedidas de residuos de Clorpirifós mayores a las acordadas por la agencia de protección ambiental (EPA). Se han detectado concentraciones del orden de $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$ en cuerpos de agua, del mismo modo se han reportado residuos de Clorpirifós en suelos en el rango de 499 mg/kg y 295 mg/kg, en un estudio de Pozo *et al.*, 2016 señala concentraciones en la atmósfera de Chile del orden de $\sim 14.600 \text{ pg/m}^3$, además Meftaul *et al.*, 2019 señala que ha sido reportado Clorpirifós en leche materna.

En la actualidad los métodos de identificación y cuantificación de pesticidas se basan en la cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Estos

métodos permiten la detección precisa del CP, sin embargo, estos métodos convencionales para monitorear plaguicidas requieren pasos de extracción y cleanup que requieren un considerable tiempo de análisis, personal altamente capacitados, equipos costosos y no son convenientes para análisis *in situ* (Xu *et al.*, 2018). En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos analíticos para detección de compuestos orgánicos fosforados (POC), como el avance de biosensores para plaguicidas (Li *et al.*, 2015). En general, las técnicas más utilizadas para el análisis de Clorpirifós se dividen en tres categorías de análisis químico, bioensayos, tecnología de sensores y tecnologías de biosensores (incluye el término nanoaptasensores), la tecnología del biosensor se considera una alternativa al problema señalado en párrafo anterior (Liu *et al.*, 2019).

Entre los diferentes tipos de biosensores destacan los aptasensores, el cual está constituido de un receptor biológico denominado aptámeros que son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que adoptan estructuras tridimensionales únicas que les permite reconocer un analito específico con gran afinidad (Liu *et al.*, 2019).

Los NAS colorimétricos proporcionan enfoques analíticos alternativos para la detección de residuos de pesticidas, además son fáciles de fabricar y la señal se puede visualizar a simple vista, entre los diversos nanobiosensores colorimétricos, los basados en AuNPs ha tenido un crecimiento sostenido debido a las ventajas inherentes de las nanopartículas (ópticas y electrónicas), específicamente relacionado con el Plasmón de Resonancia Superficial ya que exhibe sus propiedades ópticas, en la región visible (300-800 nm) del espectro electromagnético cuando están se dispersan en comparación cuando están agregadas, en consecuencia el cambio en el color de las nanopartículas puede monitorearse fácilmente a simple vista y confirmar mediante espectroscopía UV-vis (Zun *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2022).

La clasificación de los nanomateriales de acuerdo con su origen agrupa a las nanopartículas de oro (AuNPs) dentro de categoría de nanomateriales de ingeniería más utilizados en investigación científica para dispositivos

industriales, médicos monitoreo ambiental y aplicaciones de alta tecnología, porque representan una clase única de sustancias que a tamaño nano presenta características fisicoquímicas únicas características mejoradas eficiencia catalítica, conductividad entre otras particularidades, así también evaluar el impacto en el medio ambiente de los nanomateriales (Zhang *et al.*,2021; EPA, 2007).

La persistencia y degradación del Clorpirifós en las diferentes matrices ambientales está influenciada por parámetros físicos, químicos y biológicos que contribuyen a la degradación de clorpirifós en el medio ambiente, siendo los procesos clave la hidrólisis, la oxidación y degradación fotolítica. Los metabolitos toxicológicamente más relevantes de CP corresponden al 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), 3,5,6-tricloro-2- metoxipiridina (TMP), O-etil-O-(3,5,6-tricloro-2- Piridoilo (ácido Fosforotioato) y Clorpirifós oxón (EPA, 2012). Así mismo, el monitoreo y la determinación de contaminantes ambientales es un paso crucial en la gestión de riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Mahmoudpour *et al.*, 2019). Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis, se optó por un pesticida representativo y de amplio uso en la agricultura en Chile y a nivel mundial como objeto de investigación con el propósito evaluar el comportamiento de un nanoaptasensor para Clorpirifós utilizando como transductor nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas con la finalidad de detectar la presencia de Clorpirifós y metabolitos en muestras de aguas reales y estimar la especificidad y selectividad del aptámero para Clorpirifós y sus metabolitos en modelos experimentales de laboratorio y muestras de agua reales utilizando un nanoaptasensor. Así también caracterizar la situación del escenario ambiental actual y la trazabilidad ambiental del pesticida Clorpirifós.

Parte de este trabajo de tesis de magister fue enviado a la “revista entre ciencia e Ingeniería” de la Universidad Católica de Pereira, Colombia. El artículo de revisión bajo una mirada crítica sobre los avances en detección para Clorpirifós basado en biosensores. A la fecha de presentación de esta tesis de postgrado se encuentra aceptado y publicado review bajo el título “Influencia de la degradación del clorpirifós en la detección analítica utilizando biosensores: revisión del estado actual y aspectos futuros”.

CAPITULO 2

ESTADO DEL ARTE

Contaminación por Clorpirifós

Aunque los pesticidas juegan un papel positivo en el control de plagas y enfermedades, su uso también se ha visto implicado en la pérdida de biodiversidad, (Song *et al.*, 2020), Dentro de los compuestos organofosforados el Clorpirifós es ampliamente utilizado y detectado en zonas urbanas o remotas (Zhong *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2019).

El Clorpirifós ingresa al medio ambiente en forma directa a través de su aplicación, se ha utilizado comercialmente desde la década de 1960 y se clasifica como POC de amplio espectro, de fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, de baja solubilidad en agua y sus productos de degradación o metabolitos toxicológicamente relevantes son a 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), 3,5,6-tricloro-2- metoxipiridina (TMP), O-etil-O-(3,5,6-tricloro-2-Piridilo) y Clorpirifós oxón. Das y Adhya, 2015 señala que los productos de transformación del CP son extremadamente peligrosos en comparación con el compuesto original (Fig.1).

La utilización de clorpirifós ha causado la contaminación de varios ecosistemas como el suelo, sedimentos, agua, aire, alimentos, así también, la interrupción de los ciclos biogeoquímicos (Dar *et al.*, 2019).

La presencia de plaguicidas en los distintos compartimientos ambientales se ha convertido en una tarea prioritaria. Para el control y manejo apropiado de plaguicidas, algunas organizaciones, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea (UE), han adoptado políticas para el manejo de pesticidas / plaguicidas y se han definido los niveles máximos de residuos (LMR) en productos agrícolas, alimentos y cuerpos de agua (Uniyal *et al.*, 2018) (Tabla 1).

La detección es uno de los enfoques clave para el manejo de la contaminación por plaguicidas, que requiere el desarrollo de nuevos métodos para la detección en tiempo real (Liu *et al.*, 2019).

Tabla 1. Descripción general de las regulaciones ambientales para Clorpirifós.

Matriz	Indicador	Ente regulador
Aguas ambientales: Continental y artificiales	0,1 ppb, y 0,5 ppb (MAC)	EU, 2015-2018
Para el consumo humano	30 ppb (ADI) 0,1 ppb (MAC)	Directiva 98/83/EC sobre la calidad del agua destinada a consumo humano. OMS 2018
Agua dulce Agua salada	0.083- 0.041 ppb (CCA)	USEPA 1987
Productos de consumo: Frutas Cítricos Frutas Leche de Vaca	1500 ppb (LMR) 10 ppb (LMR) 20 ppb (LMR)	Reglamento (UE) 2018/686
Algas y organismos procariotas	10 ppb (LMR)	Reglamento (UE) 2018/686

MAC: concentración máxima permitida

LMC: Límite máximo de residuos

ADI: consumo diariamente aceptable

CCA: Criterio calidad del agua

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

OMS: organización mundial de la salud

EU: Unión Europea

Degradación del Clorpirifós

Tanto los procesos bióticos como los abióticos contribuyen a la degradación de clorpirifós, sin embargo, uno de los procesos clave es la hidrólisis enzimática y susceptibilidad a la fotodegradación por la luz solar (Liu *et al.*, 2019). El coeficiente de adsorción es un indicador de disponibilidad para la

acción de los microorganismos que son los que degradan principalmente al CP en las matrices ambientales (Kumar *et al.*, 2018), sino también, para ser transportado en el agua, por lixiviación o escurrimiento. Entre otras condiciones ambientales que regulan la degradación de los plaguicidas se destacan las propiedades de la matriz, factores climáticos, características fisicoquímicas del CP, contenido de materia orgánica y potencial rédox que condicionan su disponibilidad en el medio ambiente. Sin embargo, en ambientes interiores domésticos, el clorpirifós puede permanecer durante varios meses debido a la relativa falta de luz solar, agua y microorganismos del suelo que contribuyen a su degradación (Hang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2019).

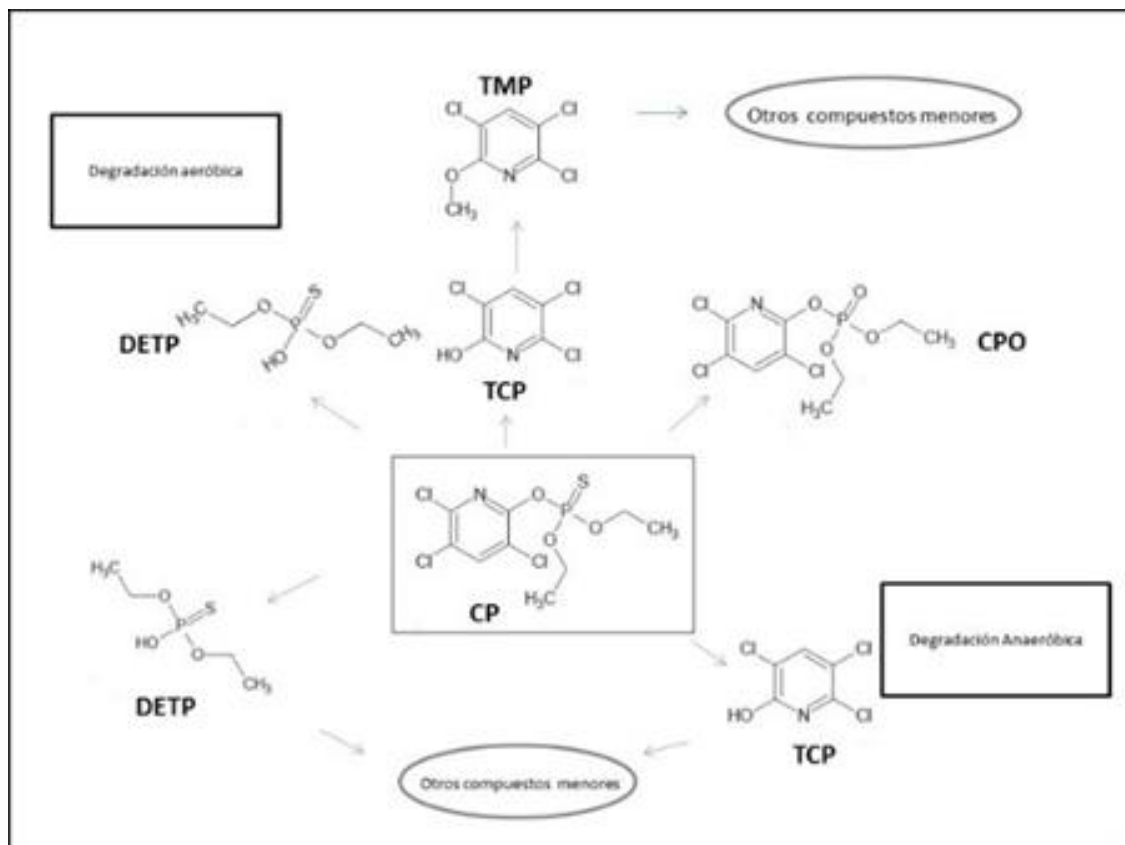


Figura 1. Ruta propuesta para la degradación aeróbica y anaeróbica para Clorpirifós. Se muestra los productos de degradación bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas modificado de Dar *et al.*, 2019.

Efectos del Clorpirifós sobre la salud y medio ambiente

Las vías de exposición a pesticidas en las personas incluyen la ingestión, inhalación y exposición cutánea. La ingesta de alimentos y agua contaminadas es la vía principal de exposición a plaguicidas y genera efectos sistemáticos, así también puede ser transferido a través de la cadena alimentaria y descrito como potencialmente cancerígeno para las personas (Sun *et al.*, 2020). En Chile la principal causa de las intoxicaciones es generada por inhibidores de acetilcolina (AChE) con un 29,3% del total de casos reportados por el Ministerio de salud, Chile (2015).

La importancia ambiental radica en la presencia de clorpirifós en aguas subterráneas que son la fuente más importante de suministro de agua potable en numerosos países incluido Chile (Islam *et al.*, 2019) (Tabla 2). Se han reportado al menos 143 pesticidas incluido el Clorpirifós y 21 productos de transformaciones en agua subterráneas (Islam *et al.*, 2019) que ha derivado en la contaminación de aguas subterráneas a nivel mundial (Zhang *et al.*, 2019).

La presencia de Clorpirifós en matrices ambientales representa una amenaza para la salud de las personas, puesto que afecta la reproducción masculina (Zhang *et al.*, 2020), un neurotóxico (Lockridge *et al.*, 2019) y considerado un Disruptor endocrino (John y Shaik, 2015).

Por lo tanto, la toxicidad de CP en el medio ambiente ha conducido a desarrollar nuevos métodos de detecciones, de bajo costo y que permita la realización de análisis *in situ* y en tiempo real.

Tabla 2 Revisión bibliográfica de algunas concentraciones detectadas de Clorpirifós en distintas matrices ambientales bióticas y abióticas.

Matriz	Concentraciones detectadas	Técnica de detección	Referencias
Aire	0,02-146 ppb	CG-MS	Pozo et al.,2016
Aire	146,24 ppb	CG-MS	Cortes et al.,2020
Sedimentos	6,33–560 ppb	LC-MS-MS	Masiá et al.,2015
Lodos	0.45–703 ppb		
Suelos	20.7–65.308 ppb		
Agua de lago	3.27–9.31 ppb	HPLC	Hu et al.,2020
Sangre humana	0-490 ppb	CG-ECD	Mathur et al.,2005
Agua de mar - atmosfera	1,4-0,2 ppb·d ⁻¹	(GC-HRMS	Bigot et al.,2016
Hortalizas	3470 ppb	GC-FPD GC-ECD	Hwang et al.,2018
Orina	1,03 ppb	UPLC-MS-MS.	Wang et al.,2016
Leche pasteurizada	85-355 ppb	GC-ECD GC-MS/	Sanghi et al.,2003
Nueces	7.2–77.2 ppb	GC-FPD GC-ECD	Han et al.,2017
Maíz	0-12.400 ppb	GC-MS	Marchis et al.,2012
Agua de río	-0.2 ppb	CG-MS	Climent et al.,2019
Aire urbano	0,03-0,58 ppb	CG-MS	Estellano et al.,2015
Tubería de aguas	0,5 ppb	Amperométrico	Arduini et al.,2006
Agua de riego	12 ppb	CG-MS/MS	Chawla et al.,2018
Agua y uvas para vino	6 x 10 ⁸ ppb	Espectroscopia de reflectancia	Koukouvinos et al.,2017
Agua de lluvia	0,0005 ppb	CG-MS	Kurt-Karakus et al.,2017
Lago	0,043 ppb		

CG-MS: Cromatografía de gases - Espectrómetro de masas
CG-ECD: cromatografía de gases con detector de captura de electrones
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

La medición cuantitativa de clorpirifós en muestras de alimentos, agua, aire y suelo resultantes del monitoreo ambiental permite estimar de forma indirecta los posibles niveles de contaminación lo que involucra garantizar una buena trazabilidad de la problemática ambiental (Kamiloglu *et al.*, 2019) y particularmente la necesidad de comparar datos a escalas temporales y espaciales, a nivel nacional e internacional establecidos por los entes reguladores gubernamentales de contaminantes prioritarios a nivel global

(Convenio de Estocolmo 2004; Brusseau (2019) Environmental Pollution, Editor(s): Mark L. Brusseau, Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, (Third Edition).

El uso de plaguicidas conduce a una contaminación difusa en las matrices ambientales, es decir, afecta los cuerpos de agua desde fuentes como escorrentías de áreas agrícolas que drenan hacia las aguas subterráneas, ríos, o hacia el mar. Los residuos del plaguicida original y los productos de degradación pueden acumularse en el medio ambiente y llegar directamente a las personas a través de los productos de consumo (Fig.2) donde se ejemplifica la movilidad del plaguicida procedente de la actividad agrícola y en consecuencia su destino final en el medio ambiente.

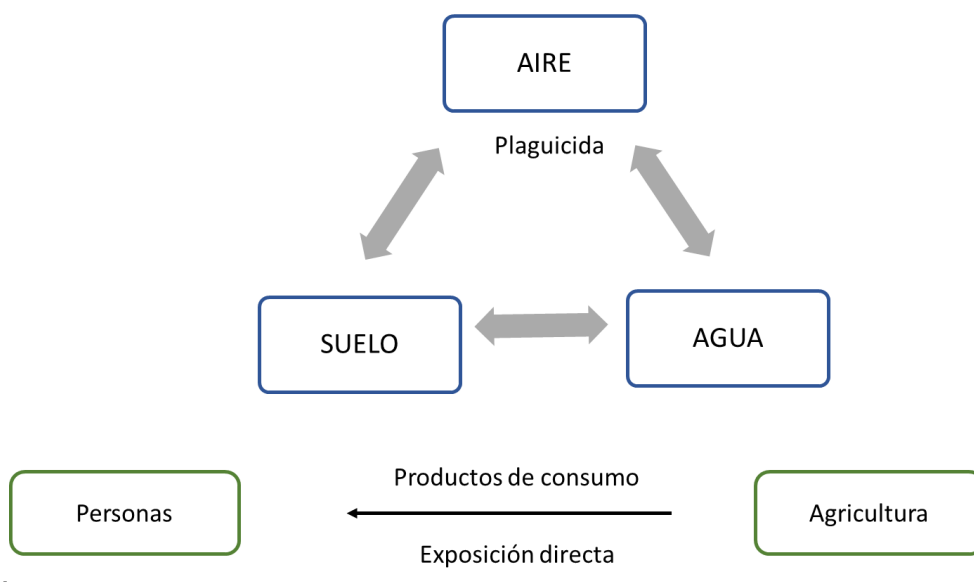


Figura 2 Destino ambiental del plaguicida Clorpirifós en el medio ambiente. Se presenta una movilidad en las interfases suelo- agua-aire para clorpirifós y como consecuencia una exposición directa e indirecta por las personas.

¿Que son los biosensores?

De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), “Un biosensor es un dispositivo receptor-transductor integrado, capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa que utiliza un elemento de reconocimiento biológico” (Fig.3).

La relación entre el elemento biológico y transductor permite el estudio cuantitativo de la interacción entre analito de interés que puede ser molécula o un grupo de familia química que tenga una afinidad de unión específica al elemento de reconocimiento biológico, es decir, un biosensor es un dispositivo analítico que usa las reacciones bioquímicas para detectar compuestos químicos mediante señales eléctricas, térmicas, piezoeléctricas u ópticas. (Thevenot *et al.*, 1999; Pacheco *et al.*, 2017; Arjmand *et al.*, 2017; Chawla *et al.*, 2018). Los biosensores permiten detectar una gran variedad de sustancias químicas y dentro de los elementos de reconocimiento biológico ampliamente descritos se encuentran los ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, anticuerpos y aptámeros (Wang *et al.*, 2014; Duhan *et al.*, 2017).

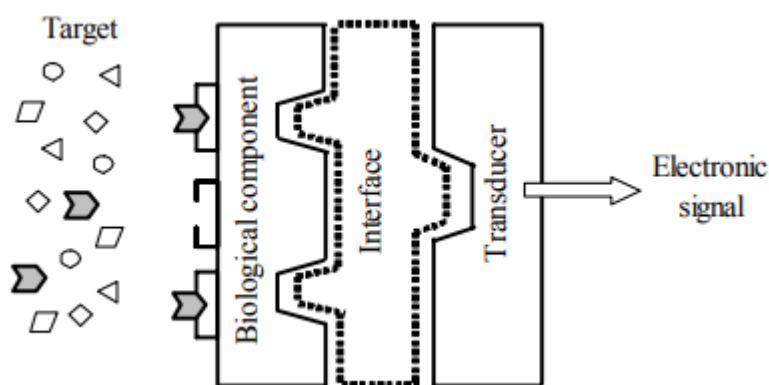


Figura 3 Esquema básico de los componentes de un Biosensor. Composición elemento de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema electrónico. (Ion *et al.*, 2013).

Biosensores para la detección de Clorpirifós

Para la de detección de Clorpirifós se han descritos ampliamente biosensores basados en enzimas y anticuerpos. (Huang *et al.*, 2013) en los últimos años se observa un aumento en el desarrollar de biosensores basados en aptámeros principalmente para evaluaciones de calidad alimentaria y progresos para la detección de residuos de clorpirifós en matrices ambientales.

Los biosensores comerciales descritos para POC pertenecen a los métodos de screening como los kits de prueba de plaguicidas de la compañía RENEKABIO que utiliza el método de inhibición de la enzima colinesterasa, kit de detección de plaguicidas de la compañía ANP Health que utiliza el mismo método de inhibición y por último el kit NIDS ACE II de la compañía Charm Sciences Inc. permite realizar un barrido de residuos plaguicidas organofosforados en frutas y agua potable (Di Nardo, 2020).

Los biosensores se clasifican según dos principios, el primero, principio de transducción, como biosensores ópticos incluye plasmón de resonancia y fibra óptica, biosensores electroquímicos incluye amperométrico, de impedancia y biosensores piezoeléctricos que incluye los biosensores de microbalanza de cristal de cuarzo. El segundo principio de clasificación es de acuerdo con el elemento de reconocimiento biológico como los Inmunosensores, aptasensores, genosensores y biosensores enzimáticos, cuando se utilizan anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos y enzimas, respectivamente. En particular los elementos de reconocimiento biológico más estudiados para Clorpirifós (Fig.4) son las enzimas>, anticuerpos,> ácido nucleico>, aptámeros > células enteras en este orden de publicaciones científicas (Justino *et al.*, 2017). En la Fig. 4 se describe biosensores microbiológicos, biosensores basados en ácido desoxirribonucleico, inmunosensores basados en anticuerpos , biosensores enzimáticos y los descritos los últimos años los aptasensores y el mecanismo de acción para cada uno de los biosensores.

En el área ambiental, la mayoría de biosensores se identifican como inmunosensores y biosensores enzimáticos, pero recientemente se ha incrementado el desarrollo de aptasensores, debido a las características propicias de los aptámeros como la habilidad de ser modificados, presentar estabilidad térmica, y la posibilidad de diseñar sus estructura, para detectar objetivos con diferentes grupos funcionales para el monitoreo de contaminantes orgánicos potencialmente tóxicos (Justino *et al.*,2015; Lang *et al.*,2016; Hassani *et al.*,2017; Jiao *et al.*, 2017).

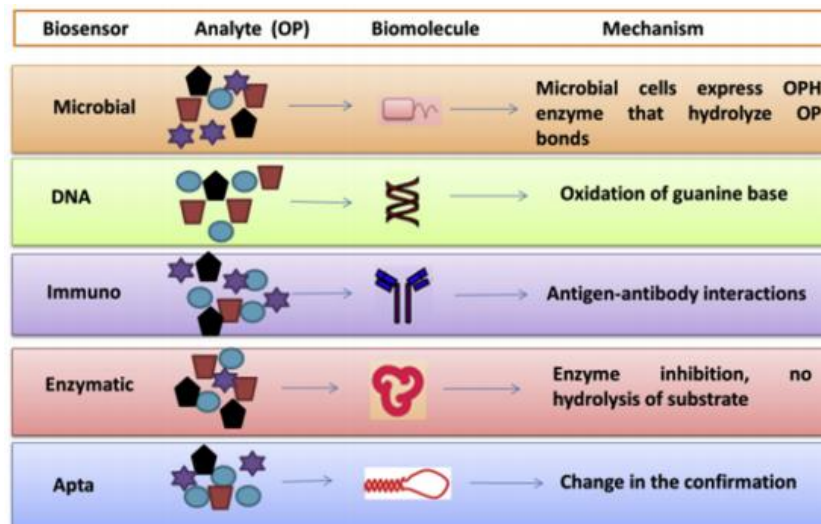


Figura 4 Principales Biosensores y materiales biológicos para la detección de compuestos organofosforados- Clorpirifós. Se muestra los principales bioelementos de reconocimiento biológico descritos para clorpirifós. *fuentes:* (Kaur - Prabhakar 2017).

Los principales atributos de los biosensores es su alta estabilidad, especificidad para analitos tóxicos, microcontaminantes, detección rápida, precisión y reproducibilidad. Las principales ventajas es la posibilidad de monitoreo *in situ*, de medir contaminantes en matrices ambientales con una mínima cantidad de volúmenes de muestras, dar solución a la carga analítica y reducir los pretratamientos analíticos de las técnicas clásicas de detección es importante señalar que las moléculas de reconocimiento biológico juegan un papel fundamental en el avance de biosensores (Bucur *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020).

Nanotecnología

La terminología “nano” abarca las técnicas de manipulación de la materia a escala atómica y molecular a tamaño de partícula inferior a 100 nanómetros (nm) y tiene con la finalidad potenciar las propiedades físicas, químicas y biológicas, en un marco científico interdisciplinario para desarrollar y manejar los materiales a tamaño nanoescala con potenciales aplicaciones en la industria, medicina, agricultura, medio ambiente y área militar (Ali Ma *et al.*, 2014).

La nanotecnología es una rama prioritaria en países como China, y se encuentra en la agenda de la Organización de Estados Americanos (OEA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) orientado, a políticas públicas, a saber, tratamiento de purificación de agua potable, medicina y energía en América Latina. En países, como Chile hay capitales dirigidos explícitamente a la nanotecnología con alianza con empresas privadas que generan start-ups y competitiva con otras disciplinas científicas (Foladori *et al.*, 2013).

Nanomateriales

Los nanomateriales se han utilizado ampliamente para la construcción de biosensores por sus excelentes propiedades físicas y químicas como la electrónica, óptica, mecánica y térmicas. La propiedad que entrega la relación volumen/superficie, conductividad electrónica, excelentes propiedades magnéticas y fisicoquímicas (Wang *et al.*, 2010), los nanomateriales se pueden asociar en distintas clasificaciones, pero una de las más importantes es atendiendo a su forma de síntesis, como la estrategia Top-Down que consiste en la elaboración de nanomateriales a partir de materiales de mayor escala que se va reduciendo hasta alcanzar la escala nanométrica y la estrategia Bottom-Up que consiste en la construcción de estructuras (Mahmoud *et al.*, 2019).

Por lo general, los nanomateriales ampliamente descritos corresponden a los, nanotubos (CNT), grafeno, puntos cuánticos (QD), polímeros conductores (CP) y nanopartículas metálicas (MNPs). Estos cinco tipos de nanomateriales son muy utilizados debido a sus características como gran similitud para la bioconjugación, alta conductividad eléctrica, atractivas propiedades, electroópticas y fisicoquímicas. La particularidad implica que, al reducir el tamaño de los materiales a escala nanométrica, aumenta la superficie de contacto, lo que favorece las interacción de los átomos y moléculas, facilitando las fuerzas de atracción y repulsión que provocan efectos superficiales, electrónicos y cuánticos, resaltan los comportamientos ópticos, eléctricos y magnéticos lo que involucra que con una pequeña cantidad de nanomaterial se puede modificar y mejorar significativamente las propiedades de los

materiales y ser más reactivos químicamente. (Acevedo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018).

Como transductores de señales analíticas se han utilizado diversos tipos de nanomateriales como el oro (Au), plata (Ag), sílice (Si), paladio (Pd), nanotubos de carbono y grafeno (Chawla *et al.*, 2018). Estas nanoestructuras poseen propiedades químicas y ópticas únicas, tales como autoensamblaje, biocompatibilidad, resonancia del plasmón superficial (SPR), dispersión de luz de resonancia (RLS) (Kumar *et al.*, 2017). Estas propiedades únicas permiten una detección rápida de una variedad de compuestos y pequeños iones, biomoléculas y microorganismos (Wu *et al.*, 2017). Entre los nanomateriales, las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentran entre las más utilizadas para ensayos de detección colorimétrica debido a su preparación simple y modificación de superficie, así como resonancia de plasmón superficial (Kelly *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2019; Phopin *et al.*, 2020). Se ha fijado considerable la atención en los nanomateriales como las AuNPs que hace posible desarrollar formatos simples de bioensayos colorimétrico (Su *et al.*, 2003; saha *et al.*, 2012; Kant, 2019).

Nanomateriales metálicos

Los nanomateriales metálicos son una clase de materiales funcionales con características únicas propiedades físicas y químicas, que están estrechamente relacionadas con su tamaño, composición, forma, estructura y sus aplicaciones (Sozer y Kokini, 2009).

Las nanopartículas metálicas tienen un creciente avance en el desarrollo y aplicaciones de biosensores en los últimos años. Debido a sus características particulares como gran área de superficie, alta transferencia de masa, propiedades fisicoquímicas únicas, biocompatibilidad y fácil producción (Akbarzadeh *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012). Igualmente muestran propiedades paramagnéticas por debajo de 50 nm tamaño y el desempeño de sus propiedades son excepcionales a tamaño entre los 10-20 nm (Netto *et al.*, 2013). En comparación con otras estrategias de biodetección los nanomateriales metálicos tiene virtudes que incluyen sensibilidad mejorada,

límite de detección más bajo, y análisis más rápidos (Justino *et al.*, 2013; Land *et al.*, 2017).

Además, los nanomateriales metálicos, especialmente las nanopartículas de oro (AuNPs), poseen un fenómeno característico denominado resonancia de plasmón superficial (SPR), en la que una oscilación colectiva de electrones en la superficie de la NP repercute y absorbe selectivamente una determinada frecuencia de luz incidente a escala nanométrica que cualquier cambio o alteración en el tamaño, la forma o la geometría de las partículas altera el confinamiento específico de los electrones que se refleja en el máximo de absorción y color de la solución coloidal, en consecuencia una variable importante para el uso de detecciones analíticas en tiempo real (Kelly *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2012; Unser *et al.*, 2015; Propin *et al.*, 2020).

Nanopartículas de Oro

Las AuNPs esféricas poseen propiedades útiles como las propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño, exhiben una gama de colores (marrón, naranja, rojo y morado) en solución acuosa a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 1 a 100 nm. Las nanopartículas de oro (AuNPs) exhiben muchas capacidades predominantes, tales como alta biocompatibilidad, estabilidad química, fuerte absorción de resonancia de plasmones de superficie localizada propiedad que se puede emplear para desarrollar sensores (El-Sayed *et al.*, 2005; Mel-aïne *et al.*, 2015) y alto coeficiente de extinción en la región visible. Estas propiedades han permitido el amplio uso de AuNPs en biosensores ópticos y electroquímicos, además de la combinación de tecnología de nanomateriales y elemento de reconocimiento biológico como los aptámeros han abierto una nueva alternativa para el monitoreo de pesticidas y determinación cuantitativa (Verdian *et al.*, 2018).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan características adsorción, elevada estabilidad química, estabilidad, que les permite funcionalizarse para pruebas selectivas. Debido a su tamaño nanométrico, la funcionalización se puede llevar a cabo a nivel casi molecular, lo que los hace adecuados para la

detección ultrasensible como principio de detección colorimétrico debido a su resonancia de plasmón de superficie, y para la transmisión de una respuesta bioquímica (Saha *et al.*, 2012; Wangoo *et al.*, 2014). Otros aspectos destacados incluyen forma única, y baja toxicidad (Yan *et al.*, 2014).

Las AuNPs presentan una tendencia a agregarse o colisionar entre ellas, esta oscilación inherente de los coloides crea la necesidad de buscar técnicas analíticas estabilizadoras para la superficie de las AuNPs como aminas, tioles, etc., que implícita la propia funcionalización de la nanopartícula. La estabilización puede ser electrostática, estérica o electroestérico, que significa la utilización de pequeñas moléculas cargadas que cubren la superficie de la NPs, generando una estabilización electrostática y, por lo tanto, las repulsiones originadas por las cargas de igual signos conservan a las partículas separadas. La estabilización más común y ampliamente descrita es NPs protegidas con moléculas de citrato las que se colocan en la superficie de la AuNPs confiriéndole carga negativa. Como estabilizador de dispersión para proporcionar a las NPs una fuerte repulsión electrostática contra la atracción de van der Waals (saha *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2018).

Las AuNPs de tamaño 20 nm exhibe un color rojo-rosado que puede cambiar a azul-púrpura luego de la aglomeración. El cambio de color se puede cuantificar mediante la medición de la absorbancia ya que las AuNPs en dispersión absorben luz en una longitud de onda en el rango de los 400 y 550 nm, con un pico máximo en una longitud de onda de ~520 nm, que puede disminuir y cambiar en un rango de 600 a 700 nm con un pico característico en ~650 nm después de la aglomeración. Por lo tanto, la relación de absorción A_{650}/A_{520} de las NPs se utiliza como indicador del grado de agregación de AuNPs. (Yousefi *et al.*, 2019; Phopin *et al.*, 2020).

El cambio de color de rojo a azul-purpura de las nanopartículas de oro se producen por la excitación de los electrones libres en la superficie de NPs, estas fuerzas intermoleculares (dipolos) que absorben en la región del espectro UV-Vis alrededor de los 520 nm se visualiza de coloración rojo, y cuando se deslocalizan la resonancia del plasmón superficial (SPR) y produce

una luz reflejada de color rojo cercano a los 700 nm, lo que hace que los picos de absorción y dispersión se desplacen debido a la formación de agregados (Maier, 2007; Amendola *et al.*, 2017).

El estado de agregación (aumento de su tamaño) de las nanopartículas de oro tiene un efecto sobre sus propiedades ópticas que se observa cuando el pico de la longitud de onda se desplaza hacia el rojo (~700 nm) por el incremento en el diámetro de las nanopartículas, este efecto se utiliza para ensayos de detección de residuos de contaminantes en matrices ambientales (Zhang *et al.*, 2010; Yeshchenko *et al.*, 2012). A saber, se han desarrollado biosensores electroquímicos basados AuNPs unido a enzimas para pesticidas organofosforados, sensores colorimétricos basados en AuNPs estabilizadas con cisteamina (CS-AuNPs) (Luo *et al.*, 2015), biosensores utilizando AuNPs para las construcciones de aptasensores electroquímico para detectar clorpirifós (Lin *et al.*, 2021), Otras investigaciones han informado síntesis (AuNPs) de diferentes tamaños que se manipulan como sustrato (SERS) para la determinación de residuos de CP, biosensor basado en acetilcolinesterasa y electrodo de diamante dopado con Boro, AuNPs y esferas de carbono (AChE/AuNPs-CSs/BDD) con efecto inhibitor del Clorpirifós. Además, de sensores colorimétricos (AuNPs) basados en el color de cambio, para la detección de diversos contaminantes, incluido, clorpirifós (Liu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020).

Importancia y aplicaciones de los aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos cortos monocatenarios (ARN o ADN) de 20 a 100 nucleótidos de longitud desarrollados a través del método de evolución sistemática de ligandos mediante el método de enriquecimiento exponencial (SELEX) y tiene la particularidad que puede unirse selectivamente a sus objetivos con alta afinidad (Röthlisberger *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Los aptámeros como elemento de reconocimiento biológico tienen varias ventajas sobre los anticuerpos, tales como alta especificidad, bajo peso molecular, una amplia gama de objetivos, excelente estabilidad química, fácil síntesis y modificación (Jiang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017) lo

que los convierte en una alternativa excelente para el desarrollo de biosensores para la detección de residuos de plaguicidas.

Los aptámeros podrían reconocer una amplia gama de contaminantes alimentarios y ambientales, como iones de metales pesados, plaguicidas, compuestos orgánicos persistentes (COPs), antibióticos, medicamentos, células, toxinas y microcontaminantes emergentes como los PFOs (ácido perfluorooctanosulfónico), debido a su estructura tridimensional única. La selección *in vitro* de aptámeros es relativamente económica y su selección puede llevarse a cabo en unas pocas semanas, entre los otros beneficios de los aptámeros son la simplicidad y una amplia variedad de modificaciones químicas, que facilitan su aplicación para la medición de compuestos de interés en matrices complejas unida a un elemento transductor. (Sadeghi *et al.*, 2018). Por tanto, las aplicaciones de aptámeros siguen creciendo en los diversos campos científicos de la biodetección, diagnóstico, terapias médicas, seguridad alimentaria y seguimiento medioambiental (Wu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

Los aptámeros, como cualquier oligonucleótido natural, son propensos a degradación por nucleasas, y a la temperatura, parámetros que pueden tener un impacto negativo en la eficiencia de unión aptámeros-analitos (Matsunaga *et al.*, 2015).

Modificaciones químicas de los aptámeros

Una vez que se ha identificado las secuencias de aptámeros, a través del método SELEX se pueden incorporar modificaciones para disminuir las deficiencias de los aptámeros, esto se realiza por medio de modificaciones en posiciones internas y/o en los extremos 3' y 5' de oligonucleótidos, la alteración química de aptámeros disminuye las deficiencias por degradación de nucleasas, la estabilidad térmica, unión fuera del objetivo y otros problemas de especificidad de aptámeros, así como mejorar la unión a objetivos más específicos (Zhu *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2017; Röthlisberger *et al.*, 2018).

La funcionalización de AuNPs con oligonucleótidos tiolado, implica que la ubicación de un grupo tiol que se encuentra en la terminación de un oligonucleótido permite su anclaje en la superficie de la AuNPs a través de un enlace covalente (Au-S), esta estrategia que involucra la funcionalización química post-SELEX de los aptámeros para biosensores se centra en métodos que comprende la unión covalente o adición de grupos tiol o amino en 3' o 5' para el acoplamiento con las nanopartículas de oro, puntos cuánticos, óxido de grafeno, etc.(Wang *et al.*, 2011; Matsunaga *et al.*, 2015; Nellore *et al.*, 2015; Röthlisberger *et al.*, 2018).

Para Clorpirifós se han reportado 3 aptámeros seleccionado por una biblioteca ssDNA inmovilizado por enriquecimiento (SELEX), a saber, por los autores Liu *et al.*, 2020, Xu *et al.*, 2018, Lei *et al.*, 2012, Jiao *et al.*, 2017. Lie (2022) desarrollo un aptasensor colorimétrico basado en AuNPs para detección de clorpirifós y Jiao (2017) señala un aptasensor electroquímico nanoestructurado para la detección altamente sensible de clorpirifós para muestras reales enriquecidas con el analito de estudio y que corresponde estructuralmente al aptámero seleccionado en este trabajo (Fig.5) con modificación en su extremo (-SH).

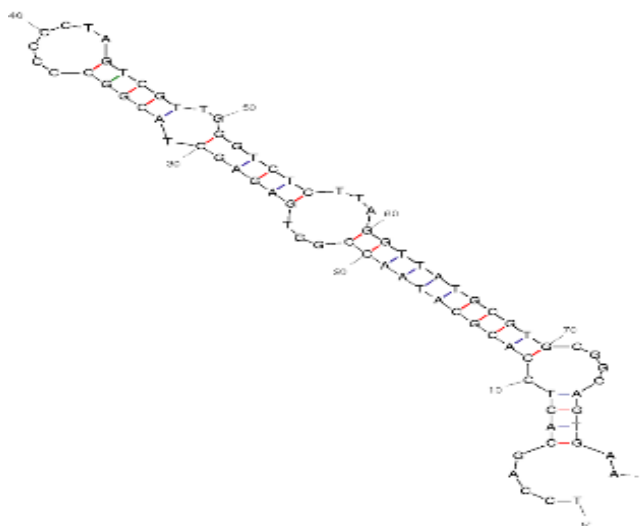


Figura 5 Aptámero específico para Clorpirifós. Se muestra el aptasensor seleccionado desde bibliografía reportado por Jiao (2017 y Lie 2022).

Aptasensor colorimétrico

Los aptasensores colorimétricos tienen como objetivo detectar un analito basado en la absorbancia de la luz a una longitud de onda específica generada de reacciones que se miden por medio de un instrumento óptico o visualización del color a simple vista. Una detección colorimétrica basada en aptámero depende de la absorción y desorción del aptámero de las nanopartículas de oro (AuNPs) en ausencia y presencia del objetivo respectivamente, en la Fig.6 se describe un esquema de un aptasensor compuesto por nanopartículas de oro y aptámero para clorpirifós en presencia y ausencia del plaguicida. Los aptámeros se absorben en la superficie de las AuNPs, en cambio en presencia del objetivo los aptámeros formar complejos con el analito o los analitos objetivos, en presencia de un agente revelador (NaCl) de agregación y desagregación que neutraliza la carga negativa de la superficie de las nanopartículas de oro causando la agregación (Citartan *et al.*, 2019). Los métodos colorimétricos se han aplicado ampliamente para la detección de contaminantes como los plaguicidas en los alimentos y el medio ambiente debido a sus excelentes cualidades físicas y químicas, incluida la preparación simple, de bajo costo y de los resultados a simple vista (Liu *et al.*, 2022).

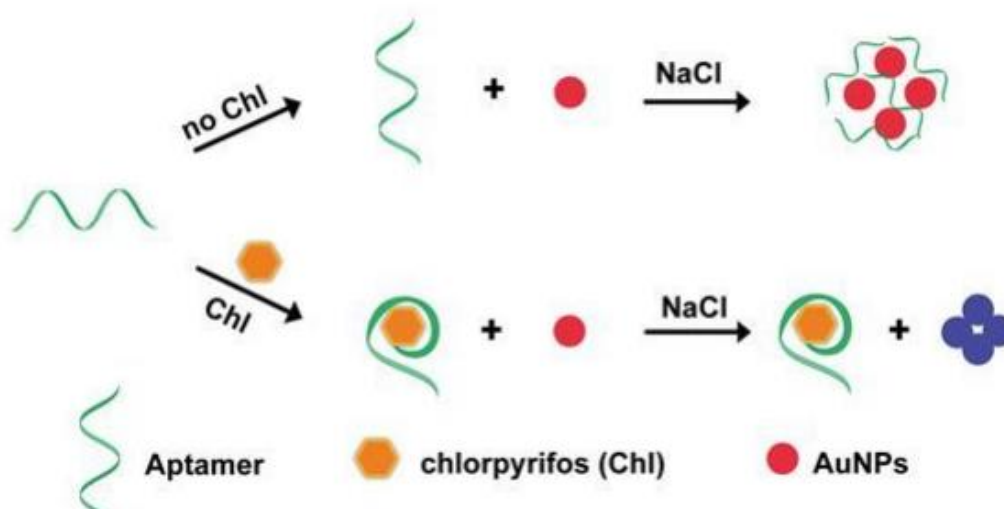


Figura 6 Representación de un aptasensor colorimétrico para la detección de Clorpirifós. Se describe el proceso de agregación de las nanopartículas de oro en presencia y ausencia de Clorpirifós. Reportado por Lei (2012).

Los factores para considerar para desarrollar aptasensores colorimétricos basados en nanopartículas son los cambios conformacionales, las propiedades de dislocación de los aptámeros unido al pesticida, la actividad de estabilización de los aptámeros hacia las NPs y por último el cambio de color de NPs (Phopin *et al.*, 2020).

En ausencia de pesticidas, los aptámeros actúan como un estabilizador para evitar la agregación de AuNPs por el mecanismo electroestérico. Su naturaleza monocatenaria hace que los aptámeros se comporten en una estructura de espiral aleatoria, lo que permite que sus nucleobases exhibidas interactúen y se unan a la superficie de las AuNPs. El ADN monocatenario (ssDNA) presenta mayor potencial para adherirse a AuNPs que el ADN de doble cadena (Bala *et al.*, 2017; Phopin *et al.*, 2020).

Concluyentemente, la combinación e interacción de nanopartículas de Oro (AuNPs) con aptámeros y el control de los factores a considerar en su desarrollo permite diseñar las condiciones analíticas para un aptasensor colorimétrico específico.

Es conveniente señalar que en Chile la contaminación por plaguicidas es una problemática actual de gran importancia por sus efectos en salud pública, además señalar que los métodos analíticos existentes son insuficientes y costosos para analizar estos compuestos en terreno. En este contexto, es ambicionado encontrar alternativas analíticas y tecnológicas que permita descentralizar el análisis de plaguicidas en el país y el nanoaptasensor basado en AuNPs es una opción potencialmente válida.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible que el nanoaptasensor sea capaz de discriminar entre clorpirifós y su metabolito clorpirifós oxón en muestras de aguas medio ambientales.

Objetivo General

Determinar la capacidad de diferenciación de un Nanoaptasensor basado en nanopartículas de Oro y aptámero específico para Clorpirifós entre el pesticida Clorpirifós (CP) y su metabolito oxón (CPO).

Objetivos específicos

Sintetizar y caracterizar Nanoaptasensor (NAS) para la detección de Clorpirifós.

Establecer los parámetros analíticos del (NAS) para Clorpirifós en matrices acuosas.

Comparar límites de detección y cuantificación del Nanoaptasensor para Clorpirifós y clorpirifós oxón con el método tradicional de cromatografía líquida (HPLC).

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍAS

El presente capítulo detalla la evaluación de la degradación de Clorpirifós en agua expuesta a luz solar a través de HPLC-DAD, la síntesis y caracterización de las AuNPs, la determinación de la concentración de las AuNPs, funcionalización de nanopartículas de oro, los parámetros de funcionalización para el NAS, a diferentes valores de pH, concentraciones de Clorpirifós, concentración de reactivo revelador, evaluación del reconocimiento del CP por el aptámero.

1. Evaluación de la degradación de Clorpirifós en agua.

Tabla 3. Reactivos, equipos y software para la evaluación de la degradación de Clorpirifós en agua.

reactivos	Equipos	software
- Estándar de Clorpirifós - Agua nanopura (18MΩ) - Agua nanopura libre de nucleasas -papel indicador pH - Acetonitrilo - Metanol	-Agitador Vortex, modelo MX-S- LABRECH- - Espectrofotómetro para microplacas UV-Visible Epoch. (BIOTEK Instruments) HPLC Agilent modelo 1100 series detector DAD-FLD columna C18	-Microsoft ® Excel 2010 - GraphPad Prism ® 8.1

Para evaluar la degradación del clorpirifós en agua, se prepara una solución de concentración de 800 ppb (partes por billón) del plaguicida bajo campana de extracción, se utiliza agua nanopura como disolvente y se expuso por 21 días a temperatura ambiente en dependencias del laboratorio en viales cerrados para evitar perdida por fugacidad. Posterior al tiempo de exposición se llevaron los viales al departamento de cromatografía de la Facultad de

Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para su análisis por HPLC-DAD marca Agilent modelo 1100. Se empleó la metodología de identificación y detección utilizada en experiencias analíticas anteriores. Las Condiciones de trabajo fueron las siguientes: se acondicionó una columna Zorbax eclipse plus C18 4.5 x 150 mm x 5 μ m marca Agilent, como fase estacionaria y como fase móvil se estableció la relación metanol: agua 85:15 v/v, a 1ml/min, se inyectó 20 μ L de la solución de CP y detector DAD a una longitud de onda de 230 nm según espectro y tiempo de retención del estándar de clorpirifós de >98,8 % de pureza marca Sigma-Aldrich (Sankar *et al.*, 2020).

2. Síntesis y Caracterización AuNPs

Tabla 4 Reactivos, equipos y software para síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs).

reactivos	Equipos	software
- HAuCl ₄ ·3H ₂ O	-Termo bloque (Select BioProducts)	-Microsoft ® Excel 2010
-C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	- Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW)	- Mendeleev ®
-C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	- Centrifuga (HERMLE 7400K)	- Gene5 ®
-NaOH	- Termobloque (Select BioProducts)	- GraphPad Prism ® 8.1
-Agua nanopura (18M Ω)	-Termociclador EPPENDORF	
- Papel indicador de pH	- Microcentrífuga (Hettich, mikro 200r)	
Resina Sephadex G-25	-Agitador Vortex, modelo MX-S-	
- Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	LABRECH-	
- Bifosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	-Agitador orbital (Barnstead Max Qmini 4000)	
- Ditiotreitól (DDT)	- Vortex Shaker (Benchmark Benchmixer)	
- Solución de Clorpirifós	- Espectrofotómetro para microplacas UV-Visible	
- Agua nanopura (18M Ω)	Epoch. (BIOTEK Instruments)	
- Agua nanopura libre de nucleasas	-Balanza analítica MRC-ASB-220-C2-V2	
- NaCl		
- Citrato de sodio tribásico dihidratado (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)		
- Borato (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O)		
-Aptámero comercial (Integrated DNA Technologies, USA)		
-Buffer Fosfato		
-PBS 7,4		

-Centrifuga microtubos marca BOECO GERMANY-M-24 -Campana extractora de gases LABTECH (FUME HOOD) -pH metro modelo HI9321pH (HANNA instruments)

La síntesis de las AuNPs fue realizada por el método de reducción por citrato (Turkevich / Frens), a partir de una solución acuosa 1 mM de HAuCl₄ de color amarillo característico y solución de Na₃C₆H₅O₇ de concentración 38,8 mM, se preparó en proporción v/v 10:1 respectivamente siguiendo el procedimiento habitual validado en el Laboratorio de Nanobiotecnología. Posteriormente las soluciones de síntesis de AuNPs fueron calentadas a 95°C por 30 min y la solución se ajustó a pH 8 utilizando NaOH (Hidróxido de sodio) se guarda a 4°C en ausencia de luz hasta su utilización. Los AuNPs sintetizados se caracterizaron usando un espectrofotómetro UV-Vis para evidenciar la existencia de la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) (Lei *et al.*, 2012; Mbambo *et al.*, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2020).

La caracterización de las AuNPs se realizó a la longitud de onda entre los 400-800 nm (UV-Vis), se mide la absorbancia de la solución coloidal y se identificó la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) característica de la síntesis de las nanopartículas de tamaño 20 nm y se estableció la concentración de las AuNPs. Parámetros importantes para la correcta funcionalización del nanoaptasensor.

Determinación de la concentración de AuNPs

El procesamiento de datos para el cálculo de concentración se basó en la ecuación de Lambert- Beer y coeficiente de extinción molar (ϵ) $2,01 \times 10^8$ de las AuNPs (Liu *et al.*, 2007) Identificada la absorbancia máxima a los 520 nm, el cálculo de la concentración de las AuNPs se obtiene utilizando la expresión matemática de la ley de Lambert-Beer.

$$\text{Abs.}_{520} = C \times \epsilon \times d \text{ (ecuación 1)}$$

Donde:

Abs.₅₂₀ = Corresponde a la absorbancia máxima de las AuNPs obtenida del equipo.

C= corresponde a la concentración de las AuNPs.

ϵ = coeficiente de extinción molar $2,01 \times 10^8$.

d= Longitud del paso óptico que contiene la muestra, donde se utilizó 150 μL corresponde de paso óptico 0,45 cm.

Una vez introducidos los valores en la (Ecuación 1) se obtuvo una concentración de AuNPs.

3. Funcionalización de AuNPs

Para la funcionalización de las nanopartículas de Oro (AuNPs) se utilizó un aptámero comercial específico para clorpirifós. (5'CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTAGGGTTACGCCTGCAGCGATTCTTGA TCGCGCTGCTGGTAAGCTTGGTTGGCACCCGCATCGT3' modificado-SH) (Jao *et al.*, 2017) Adquirido en IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Se reconstituyó utilizando agua nanopura libre de nucleasas, y se preparó a una concentración de trabajo de 100 μM .

Luego de la reconstitución del aptámero, se realizó la reducción del grupo disulfuro a tiol de estructura general R-S-S-R' a -SH por medio de una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria resina Sephadex G-25 de tamaño de partícula entre los 20-80 micrones.

Procedimiento de reducción del grupo disulfuro a tiol (Hill & Mirkin, 2006):

- a) Se prepara un volumen de 100 μL de solución de Ditioneitol (DTT) 0,1 M en buffer de clivaje (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) a pH 8,0.
- b) En un tubo tipo eppendorf de volumen 1,5 mL se adicionó, 50 μL aptámero tiolado, adquirido en IDT a la forma de disulfuro.
- c) Se agregó 60 μL de solución de Ditioneitol 0,1 M a la cantidad de aptámero, en una relación de 5 nmol de aptámero por 100 μL de buffer de clivaje.

- d) Se mezcló y dejó en un lugar seguro en el laboratorio para facilitar la reacción sin agitación durante 2 a 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente.

Procedimiento de purificación de los aptámeros a través de cromatografía de columna:

- a) Acondicionamiento de la columna que contiene la resina G-25 con 30 ml de agua nanopura libre de nucleasas que se utiliza como eluyente.
- b) Se eluye la columna que contiene la resina Sephadex G-25, 2-3 veces para eliminar posibles impurezas.
- c) Se eluye hasta que el menisco casi toque la superficie de la resina (0,5µL) y se cierra la llave de paso y descartar el volumen inicial eluído.
- d) Se agrega la mezcla aptámero-DTT a la columna utilizando pipetas Pasteur (vidrio).
- e) Se eluye la mezcla hasta que ingrese a través de la columna.
- f) Se utiliza un volumen de elución de 26 ml de agua nanopura libre de nucleasas de forma gradual y pausada para evitar generación de burbujas.
- g) Finalmente, se eluye el volumen que pasa a través de la columna dejando caer gota a gota hasta recibir un volumen de 500 µL, en tubos eppendorf previamente enumerados en orden creciente.

4. Determinación de parámetros analíticos para el aptasensor específico para la detección cuantitativa de clorpirifós.

Tabla 5 Reactivos, equipos y software para la determinación de parámetros analíticos para el aptasensor específico de detección cuantitativa del clorpirifós.

Reactivos	Equipos	software
-AuNPs funcionalizadas con aptámero - estándar de Clorpirifós	- Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW) - Termobloque (Select	-Microsoft ® Excel 2010 - Gene5 ® - GraphPad Prism ® 8.1

<ul style="list-style-type: none"> - Agua nanopura (18MΩ) - Agua nanopura libre de nucleasas - NaCl 1 M;1,5 M; 2 M;3 M --PBS 7,4 -papel indicador de pH -Acetonitrilo -Nanoaptasensor 1:10 -Nanoaptasensor 1:20 - NaCl 1M,1,5 M,2 M,3M -Sodio Citrato 2-Hidrato -(Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) -(NaOH) -Ácido clorhídrico -Ácido cloroaúrico (HAuCl₄) -Ditioneitol (DTT) -Fosfato de disódio (Na₂HPO₄) -Bifosfato de sodio (NaH₂PO₄) -Cloruro de potasio (KCl) -Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 	BioProducts -Agitador Vortex, modelo MX-S- LABRECH- -Agitador orbital (Barnstead Max Qmini 4000) - Vortex Shaker (Benchmark Benchmixer) - Espectrofotómetro para microplacas UV-Visible Epoch. (BIOTEK Instruments)	-programa TEK3
---	--	----------------

Como parámetros bioanalíticos se determinaron la proporción molar AuNPs-Aptámeros (NAS), la concentración del revelador y el pH de la reacción, para determinar los parámetros óptimos de trabajo y condiciones de la señal colorimétrica producida por el NAS en la detección del plaguicida clorpirifós.

Soluciones utilizadas para el funcionamiento del NAS. Los NAS se prepararon a pH final 6,5;7,1;7,4 utilizando una solución Buffer de fosfato (PBS) a una concentración de 0,1M.

Para cada ensayo de detección de clorpirifós, se utilizaron microplacas de 96 pocillos y el siguiente procedimiento:

- Agregar 200 µL de solución estándar de clorpirifós a distintas concentraciones (0 a 200 ppb).
- Agregar 100 µL de los distintos NAS (1:10 o 1:20), activados previamente por incubación a 80°C por 10 minutos y posterior enfriamiento a temperatura ambiente (RT).
- Incubación a 80°C por 10 min y posterior enfriamiento a RT por 20 minutos.

- Se agregaron 60 μ l de solución de NaCl a distintas concentraciones, dependiendo del análisis, como agente revelador a cada pocillo y se dejó incubando por 30 minutos a RT.

Finalmente, el seguimiento del proceso de agregación se realiza mediante mediciones de espectros de absorbancia utilizando espectrofotómetro para microplacas (EPOCH), siguiendo la agregación como la proporción entre los picos entre 520 nm y 620 nm (A_{620}/A_{520}).

5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos por espectrofotometría UV/Vis se muestran con el error estándar \pm promedio de los ensayos independientes. La significancia estadística se establece en el intervalo de confianza del 95% mediante y test de Mann-Whitney para datos no paramétricos y comparación de los grupos GraphPad Prism 8.1.

Capítulo 4

RESULTADOS

La persistencia de clorpirifós en el medio ambiente depende de la eficiencia de los procesos de degradación naturales como biodegradación, fotodegradación e hidrólisis, (Cevoski *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2017). El objetivo de estudio es la detección de CP en matrices acuosas. Se realiza inicialmente un ensayo analítico para evaluar el tiempo de vida media de clorpirifós en agua como variable a considerar para una detección efectiva del plaguicida en muestras medio ambientales de aguas superficiales. Para ello utilizo las técnicas clásicas de detección analítica.

1. Evaluación de la degradación del Clorpirifós en agua bajo condiciones experimentales de laboratorio.

Un estudio realizado por Hossain *et al.*, mostró que CP en agua destilada expuesta a la luz solar se degrada y disminuye su concentración en un 57.5% al cabo de 12 días (Hossain *et al.*, 2013). Para seguir esta degradación, solución de 800 ppb de clorpirifós en agua nanopura fue expuesta por un período de 21 días a luz solar natural. La solución fue caracterizada utilizando Cromatografía Líquida con detector de Diodo y el cambio de concentración fue seguido por HPLC con detector UV. En la figura 7 se muestra el patrón típico de absorbancia espectral para una solución de clorpirifós, se visualizan 3 máximos de absorción que indica la influencia del doble enlace conjugado incluido en la estructura de clorpirifós absorbió luz a 208 nm, 230 nm y 290 nm (Makino *et al.*, 2009).

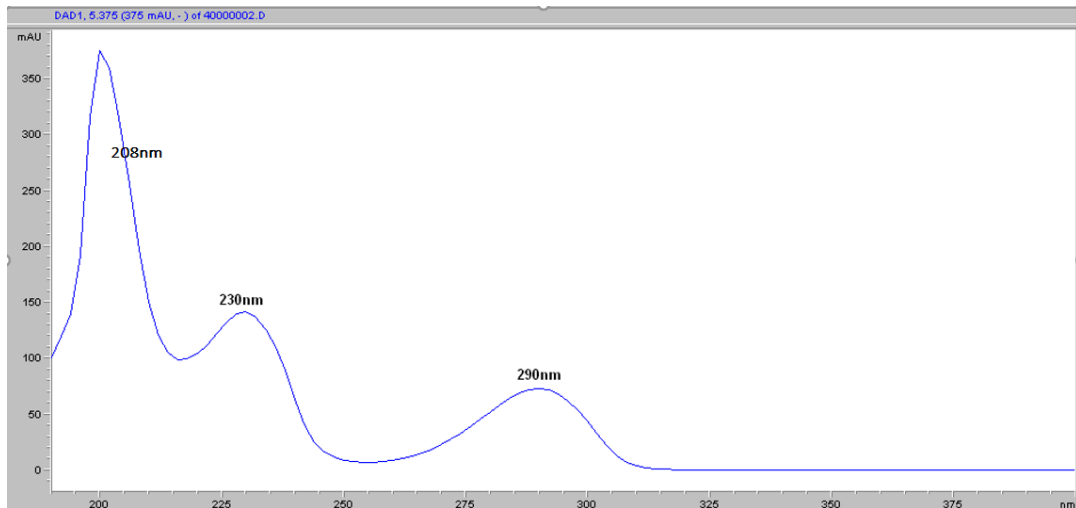
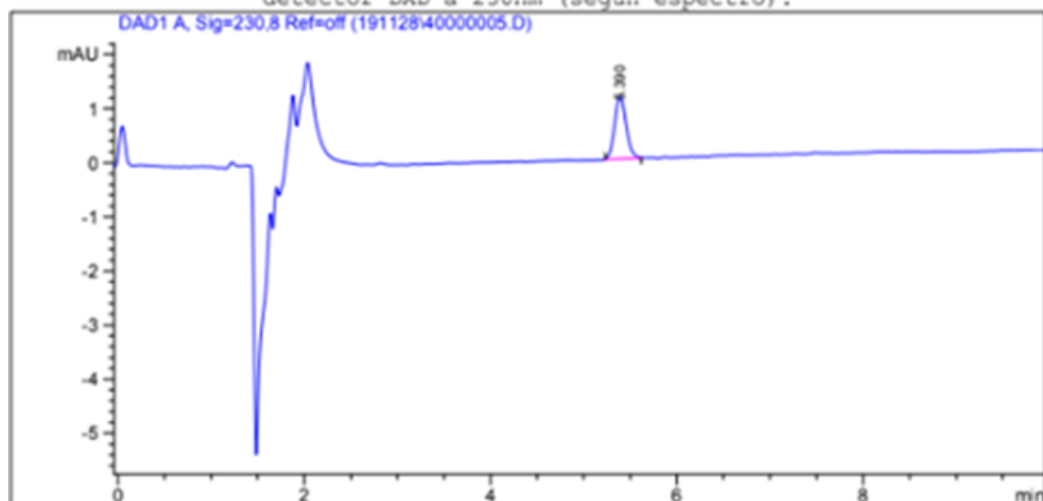


Figura 7. Espectro de absorción de clorpirifós. Se muestra el espectro de absorción de Clorpirifós obtenidos por HPLC/DAD. Se observan los 3 picos de absorción a 208 nm, 230 nm y 290 nm típicos de Clorpirifós (Makino *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2014). Se muestra el resultado de una medición (n=1).

Para evaluar la degradación del Clorpirifós disuelto en agua, se preparó 800 ppb de CP y se midió la absorbancia espectral UV para identificar sus características ópticas, de acuerdo con los valores informados por Makino *et al.*, 2009. Se realizó una lectura a través de HPLC/DAD, se muestra en la figura 8 el seguimiento de la señal de absorción para 800 ppb clorpirifós muestra un tiempo de retención del método de 5,390 min. Estos resultados expresan la identificación del plaguicida disuelto en agua por HPLC-DAD.

Acq. Method : CLORPIR.M
 Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\CLORPIR.M
 Method Info : Determinacion de clorpirifos (solo estandar)
 Columna Agilent, Zorbax Eclipse plus C18 4.5x150mmx5um
 20uL inyeccion, en metanol:Agua 85:15 a 1mL/min. tr:5.
 4min.
 detector DAD a 230nm (segun espectro).



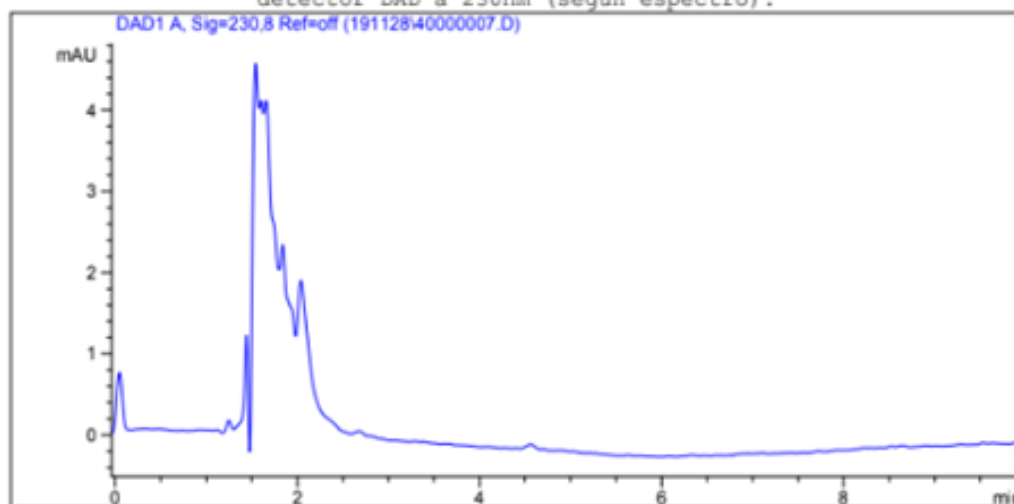
Signal 1: DAD1 A, Sig=230,8 Ref=off

Peak #	Name	RT [min]	Area	Width [min]	Height
1		5.390	9.965	0.134	1.158

Figura 8. Cromatograma de absorción para Clorpirifós. Se muestra el cromatograma obtenido por HPLC con detector de Diodo, para una solución de 800 ppb de clorpirifós en agua. Se observa la aparición de señal de clorpirifós a un tiempo de retención 5,390 min con un área bajo la curva de 9,965. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

Con el objetivo de realizar un seguimiento de la capacidad de degradación para CP disuelto en agua luego del tiempo de exposición de 21 días a temperatura ambiente, completamente cerrado expuesto a la radiación solar se realizó la lectura a través de HPLC/DAD. Para el Cromatograma de absorción para Clorpirifós incubados 21 días (Figura 9) se observó la desaparición de la señal asociada a clorpirifós, lo que sugiere la degradación de clorpirifós, tal como fue publicado anteriormente (Hossain *et al.*, 2013).

Acq. Method : CLORPIR.M
 Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\CLORPIR.M
 Method Info : Determinacion de clorpirifos (solo estandar)
 Columna Agilent, Zorbax Eclipse plus C18 4.5x150mmx5um
 20uL inyeccion, en metanol:Agua 85:15 a 1mL/min. tr:5.
 4min.
 detector DAD a 230nm (segun espectro).



Signal 1: DAD1 A, Sig=230,8 Ref=off

Peak #	Name	RT [min]	Area	Width [min]	Height
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 9. Cromatograma de absorción para Clorpirifós incubados 21 días. Se muestra el cromatograma obtenido por HPLC con detector de Diodo, para solución de 800 ppb de clorpirifós en agua (Figura 8) incubada durante 21 días a temperatura ambiente y sin protección de la luz solar. Se observa la desaparición de la señal asociada a clorpirifós mostrada anteriormente (Figura 8). Se muestra el resultado de una medición (n=1)

Sintetizar y caracterizar Nanoaptasensor (NAS) para la detección de Clorpirifós

1. Síntesis de AuNPs

Las AuNPs fueron sintetizadas por el método de Turkevich. El espectro obtenido muestra el máximo de absorción a una longitud de onda de 520 nm característico de nanopartículas de oro de entre 15 y 20 nm (Turkevich *et al.*, 1951; Zhao *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2018). La determinación de la concentración de AuNPs se basa en la ley de Beer-Lambert, utilizando un coeficiente de extinción (ϵ) de $2,01 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, corresponde $C_{\text{AuNPs}} =$

20,001 nM determinada mediante espectroscopia UV-Vis (Maye *et al.*,2003; Contreras *et al.*,2018).

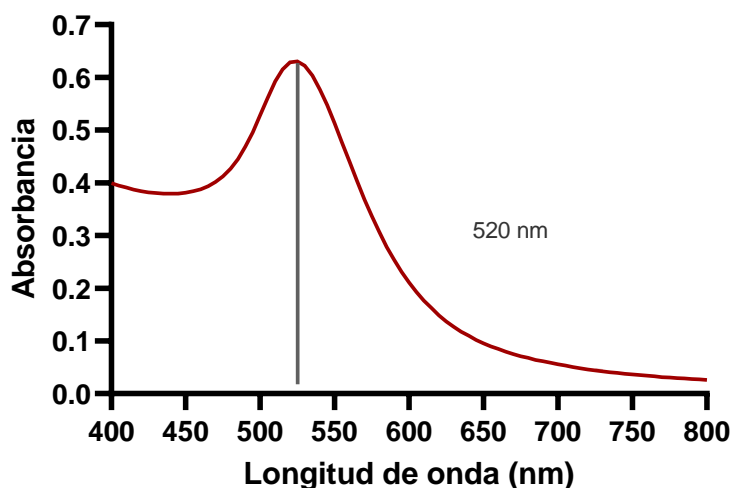


Figura 10. Espectro de absorción de solución de AuNPs. Se muestra la banda de resonancia de plasmón superficial de las AuNPs asociadas al pico de absorbancia característicos NPs a los 520 nm que corresponde al diámetro de nanopartículas de tamaño 20nm. Se muestra el resultado de una medición (n=3).

Posteriormente, la síntesis de los NASs se realizó la determinación de los parámetros analíticos de las AuNPs sintetizadas.

Determinación de parámetros analíticos de funcionalización de AuNPs.

1. Determinación de biosensores de diferente proporcionalidad nmolar de AuNPs/ aptámero para la detección de clorpirifós

Se prepara inicialmente dos aptasensores con distinta proporción nmolar de aptámero y nanopartículas identificados como aptasensor 1:10 y aptasensor 1:20. De acuerdo con condiciones experimentales previamente validadas en el laboratorio nanobiotecnología.

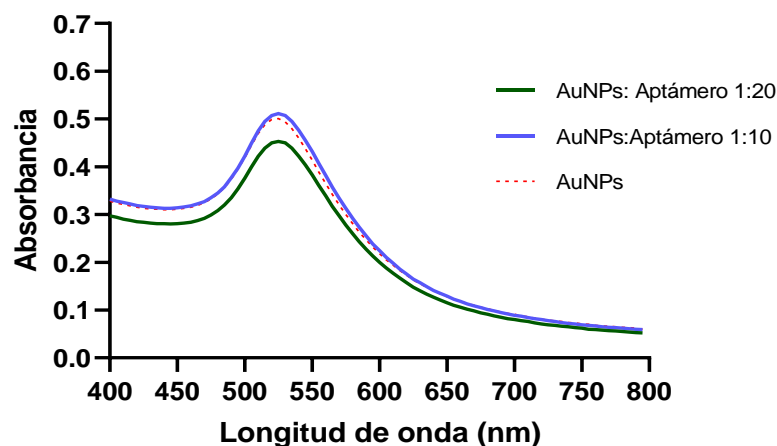


Figura 11. Espectro de Absorbancia de soluciones de AuNPs funcionalizadas con 2 proporciones de aptámeros. Se muestra el espectro de distintas soluciones de AuNPs unidas a 2 diferentes proporciones de aptámeros, donde se destaca que las proporciones nmolar AuNPs/aptámero de clorpirifós mantienen el pico de 520 nm característicos de AuNPs. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

En la Figura 11 para las dos proporciones de aptámero el ensayo sugiere una funcionalización positiva de las AuNPs obtenida a través de espectrofotometría para el rango de longitud de onda entre 400-800 nm, se advierten ligeras variaciones en la absorbancia máxima, sin embargo, se mantiene el pico de absorbancia máximo a 520 nm para los 2 aptasensores. Se observa que el aptasensor 1:10 (color azul) y el aptasensor 1:20 (color Verde) mantiene misma longitud de onda que las AuNPs sin funcionalizar, pero difieren en la intensidad de la señal. También se muestra en el gráfico que el aptasensor 1:10 se solapa con las AuNPs sin funcionalizar y no se observa una desviación en la banda SPR entre ellos.

En la Figura 12, se observó que la presencia de clorpirifós no afectaría la agregación de NAS 1:10, incluso a concentraciones de 200 ppb (6,7 veces sobre el LMR). Al analizar la agregación de NAS en presencia de sólo el revelador 1M (Figura 12 B), tampoco es posible observar variación en el espectro asociado a la agregación A_{620}/A_{520} (Contreras *et al.*, 2018; Díaz-García *et al.*, 2022). Esto sugeriría la necesidad de utilizar una mayor concentración de NaCl, para propiciar el proceso de agregación de los NAS 1:10.

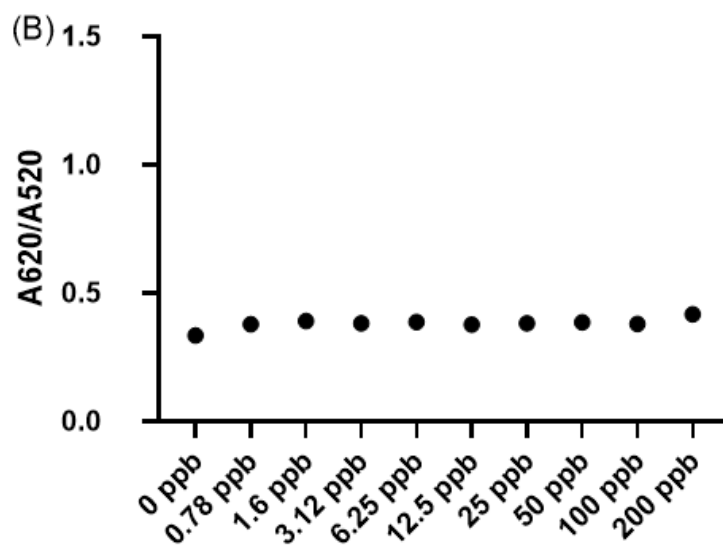
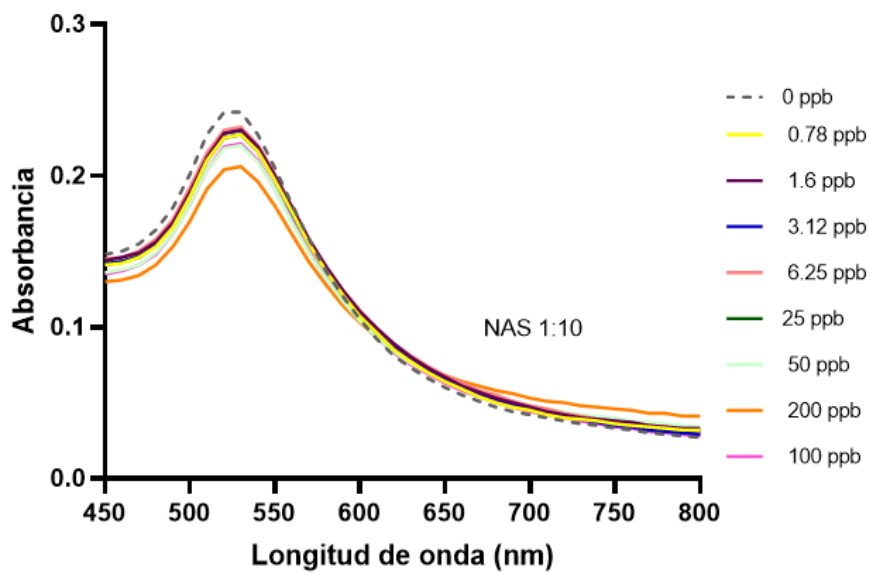


Figura 12. Determinación de Clorpirifós utilizando NAS 1:10. NAS 1:10 fueron incubados con distintas concentraciones de clorpirifós utilizando como agente revelador NaCl 1M. (A) Espectros de absorción de NAS 1:10. (B) Comparación de las relaciones de absorción A_{620}/A_{520} ante la variación de concentraciones de Clorpirifós. Se muestra el resultado de una medición ($n=1$).

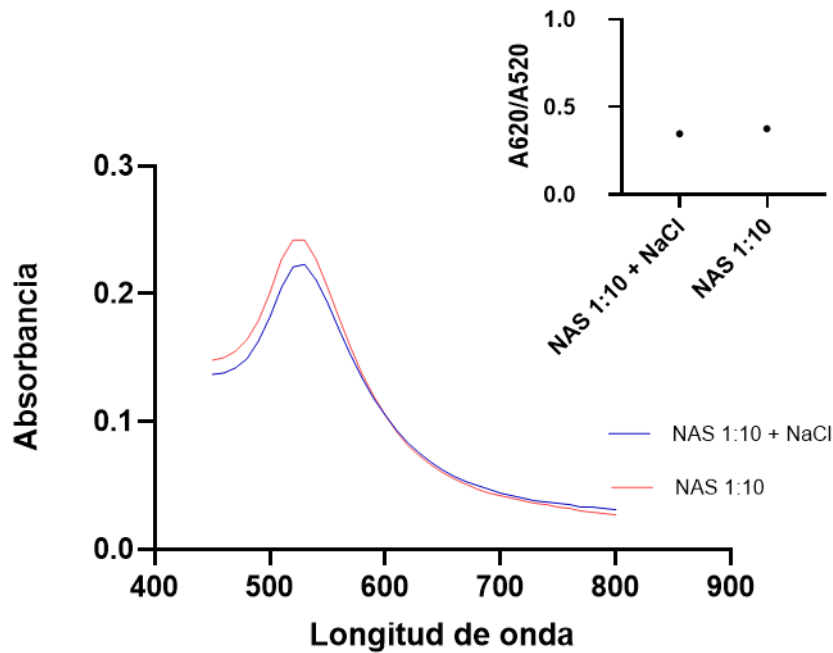


Figura 13 Determinación de agregación de NAS 1:10. NAS 1:10 fue incubado en presencia y ausencia de 1M de NaCl por 30 min. Recuadro interno muestra la proporción A_{620}/A_{520} de para el NAS en ausencia y presencia de NaCl. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

En la Figura 13 se observó que el espectro de absorbancia se mantiene a los 520 nm en presencia y ausencia de sal, solo difieren en la intensidad por aumento de la carga iónica. En el cuadro interno la relación A_{620}/A_{520} para el NAS 1:10 en presencia de 1M de NaCl incubado por 30 min. indicaría que la relación de los picos característicos para las AuNPs no presenta un cambio entre los tratamientos con sal y sin sal (0,34 y 0,37) respectivamente, la concentración de NaCl utilizada corresponde a la propuesta por Mehrdel *et al.*, 2017; Contreras *et al.*, 2018.

Análogamente, se muestra en la Figura 14 los espectros de absorción de NAS 1:20 en presencia de distintas concentraciones de Clorpirifós. Se observó la agregación inducida por NaCl a una concentración de 1 M para el NAS 1:20, en presencia de 200, 100 ppb de clorpirifós no cambia su señal de agregación en comparación al cero (0 ppb). Esto sugeriría que esta proporción no sería reactiva a la presencia de clorpirifós comparada con las concentraciones entre 0,78 a 50 ppb. Sin embargo, el comportamiento no parece ser dependiente de

la concentración, por este motivo es importante avanzar en determinar los parámetros para mejorar el proceso de detección.

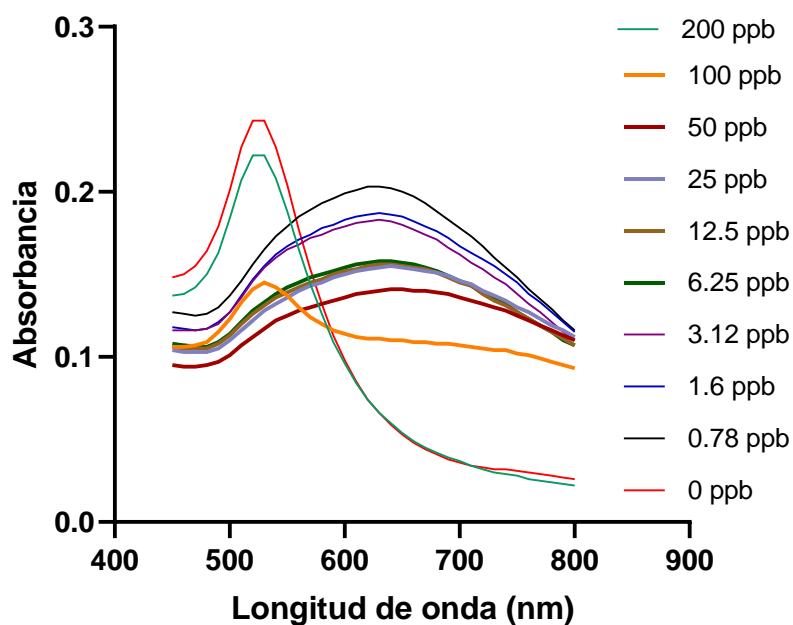


Figura 14. Determinación de Clorpirifós utilizando NAS 1:20. NAS 1:20 fueron incubados con distintas concentraciones de clorpirifós utilizando como agente revelador NaCl 1M. (A) Espectros de absorción de NAS 1:20. (B) Comparación de las relaciones de absorción A_{620}/A_{520} ante la variación de concentraciones de Clorpirifós. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

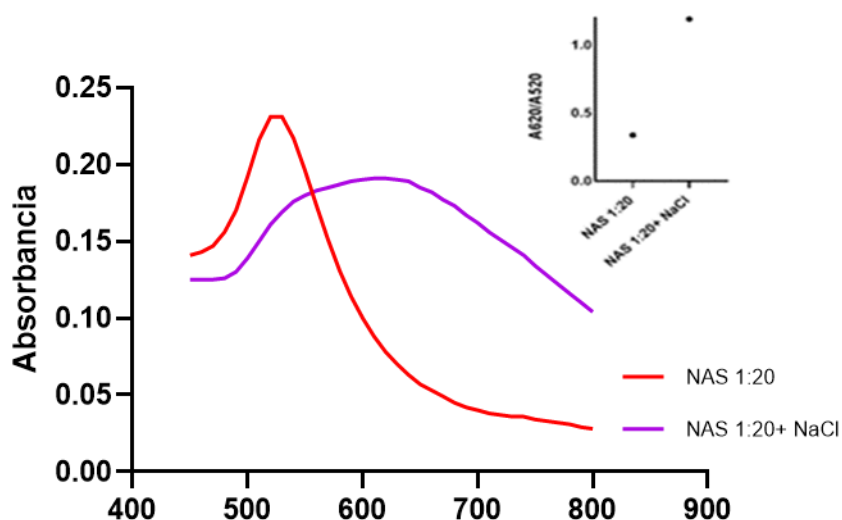


Figura 15. Determinación de agregación de NAS 1:20. NAS 1:20 fue incubado en presencia y ausencia de 1M de NaCl por 30 min. Recuadro interno muestra la proporción A_{620}/A_{520} de ambas mediciones. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

En la Figura 15 se observó que la presencia de clorpirifós afecta la agregación de NAS 1:20, Esto indicaría que una concentración de 1 M NaCl, es capaz de provocar la agregación de las AuNPs. En el recuadro interno de evaluación de la relación A_{620}/A_{520} para el NAS en presencia de NaCl y para el NAS en ausencia de NaCl, se evidencia un cambio de tamaño, una forma diferente, un ancho y pico del plasmon de resonancia superficial a los 620 nm. Las condiciones experimentales de NaCl se basan en las reportadas por Contreras *et al.*, 2018 y Diaz-García *et al.*, 2022 para monitorear el proceso de agregación.

Basado en estos resultados, se propone explorar como la concentración del revelador, puede afectar el proceso de reconocimiento.

2. Determinación de los parámetros de funcionamiento del aptasensor: NaCl

Para determinar los parámetros de funcionamiento de los nanoaptasensor 1:10 y 1:20 fueron expuestos a distintos de concentración NaCl. A partir de los resultados preliminares de funcionalización se establece la concentración óptima de trabajo. Se observó que, a mayor concentración de sal, mayor es la agregación y los cambios en la banda de absorbancia característica de AuNPs.

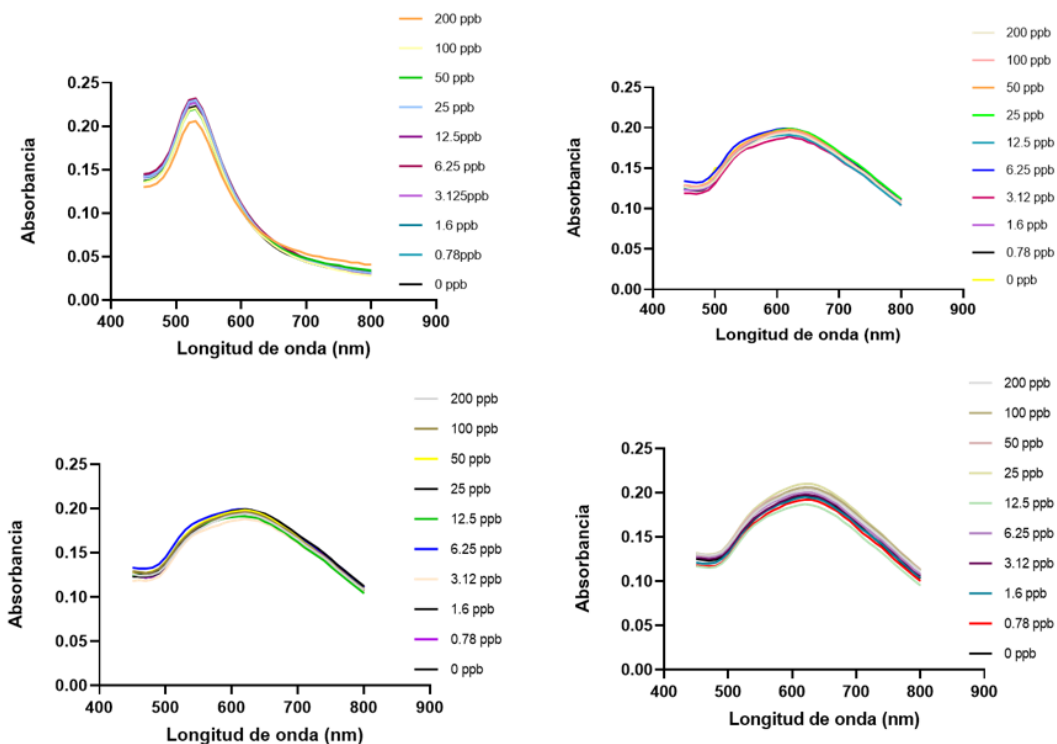


Figura 16. Determinación de efecto de la concentración del revelador en la capacidad de detección de NAS 1:10. Se muestra los espectros de absorbancia del NAS 1:10 para diferentes concentraciones de sal y concentraciones de clorpirifós en el rango de los 0 ppb-200 ppb. Se muestra el seguimiento óptico inducido por la adición de concentraciones Molares de NaCl. Se muestra el resultado de una medición ($n=1$).

En la Figura 16 se evaluó la reactividad del NAS 1:10 en presencia de Clorpirifós entre los 0 ppb – 200 ppb. Se midió el cambio del pico del plasmón de resonancia para 4 concentraciones molares de NaCl. Al adicionar 1 M de NaCl no se evidencia el proceso de agregación, en cambio al añadir 1,5 M, 2 M y 3 M de NaCl a la solución (NAS+CP) se observó un cambio óptico a longitudes de ondas más largas (~ 650 nm) por el aumento de la fuerza iónica en el medio. Los resultados indican que el NAS 1:10 es sensible a la presencia de clorpirifós a diferentes a concentraciones, pero a condiciones mayores a 1M de NaCl.

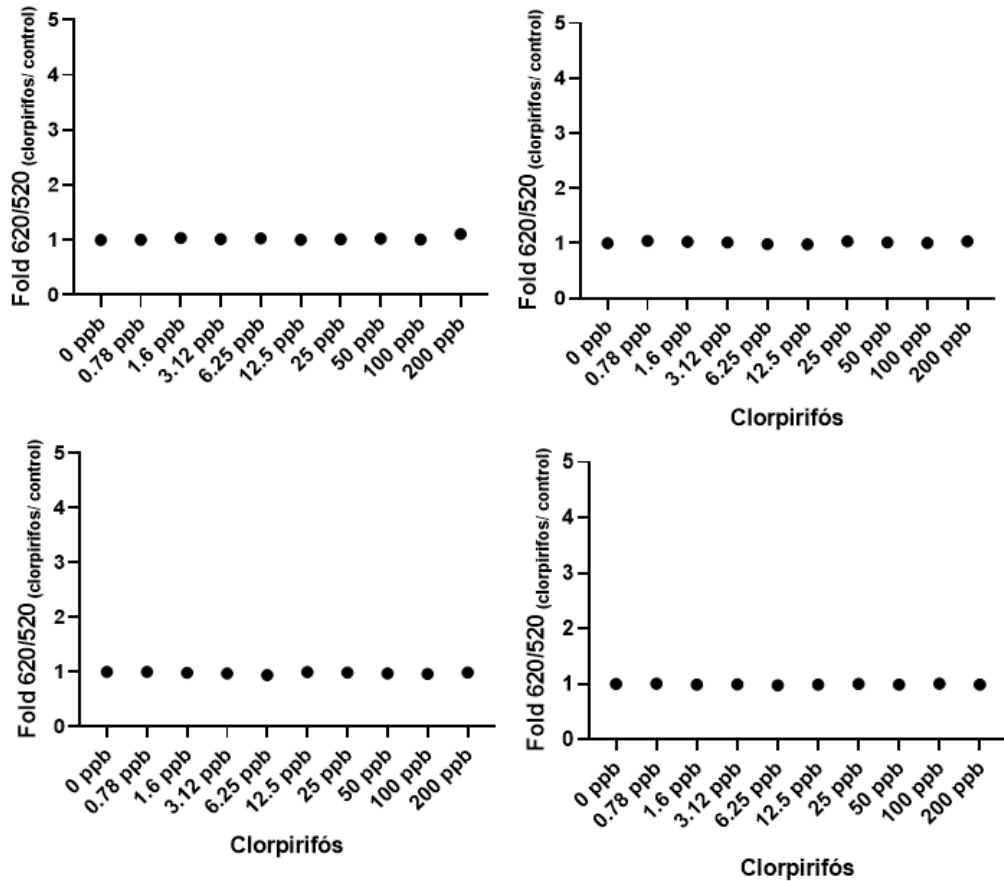


Figura 17. Representación de la relación A₆₂₀/A₅₂₀ de las NAS 1:10. Se muestra la relación A₆₂₀/A₅₂₀ para la identificación y evaluación del comportamiento óptico con respecto a las concentraciones de clorpirifós. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

En la Figura 17 se analizaron las relaciones A₆₂₀/A₅₂₀ para el NAS 1:10 para cuatro concentraciones molares de NaCl, los valores de cada medición en presencia de CP se calcularon restando el valor del NAS en ausencia de Clorpirifós (0 ppb) y se expresa utilizando razón Fold 620/520 (clorpirifós/control), los resultados sugieren que el NAS 1:10 no es sensible a la presencia de clorpirifós en el rango entre 0,78-200 ppb, más aún no es posible discriminar un estado de agregación para el NAS en presencia y ausencia de Clorpirifós.

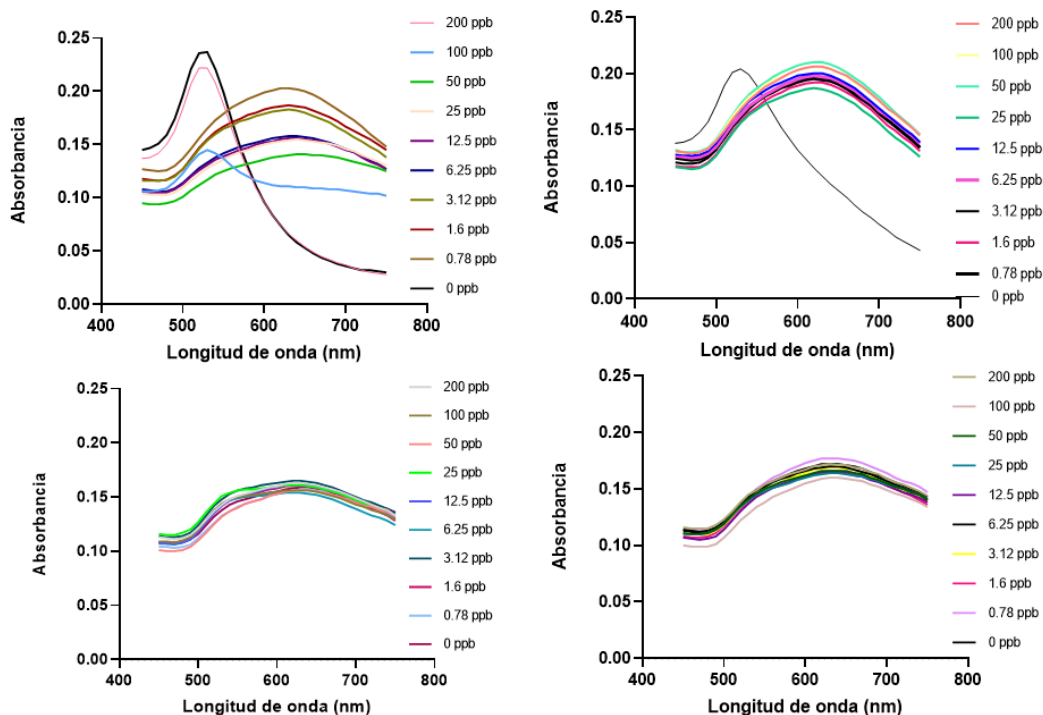


Figura 18. Determinación de efecto de la concentración del NaCl en la capacidad de detección de NAS 1:20. Se muestra los espectros de absorbancia del NAS 1:20 para diferentes concentraciones de sal y concentraciones de clorpirifós en el rango de los 0 ppb-200 ppb. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

Se muestra en la Figura 18 el ensayo que evaluó la reactividad del NAS 1:20 en presencia de clorpirifós para concentraciones entre 0 ppb – 200 ppb. Se advierte que para concentraciones molares 1 M; 1,5 M; 2 M y 3 M de NaCl se observa cambios en el plasmón de resonancia superficial a medida que aumenta la concentración de clorpirifós. Los resultados sugieren que el NAS 1:20 es sensible a concentraciones de 0,78-200 ppb de clorpirifós, además es posible identificar estados de agregación entre 0 - 50 ppb de clorpirifós después de agregar la solución salina, en cambio tras la adición de 2 M y 3 M de NaCl el NAS presenta reactividad para clorpirifós sin evidenciar una señal diferenciable con respecto a las concentraciones crecientes de Clorpirifós, sin embargo para los ensayos de adición 1,5 M de NaCl se observó la mejor condiciones analíticas de reactividad del NAS ante la presencia de clorpirifós.

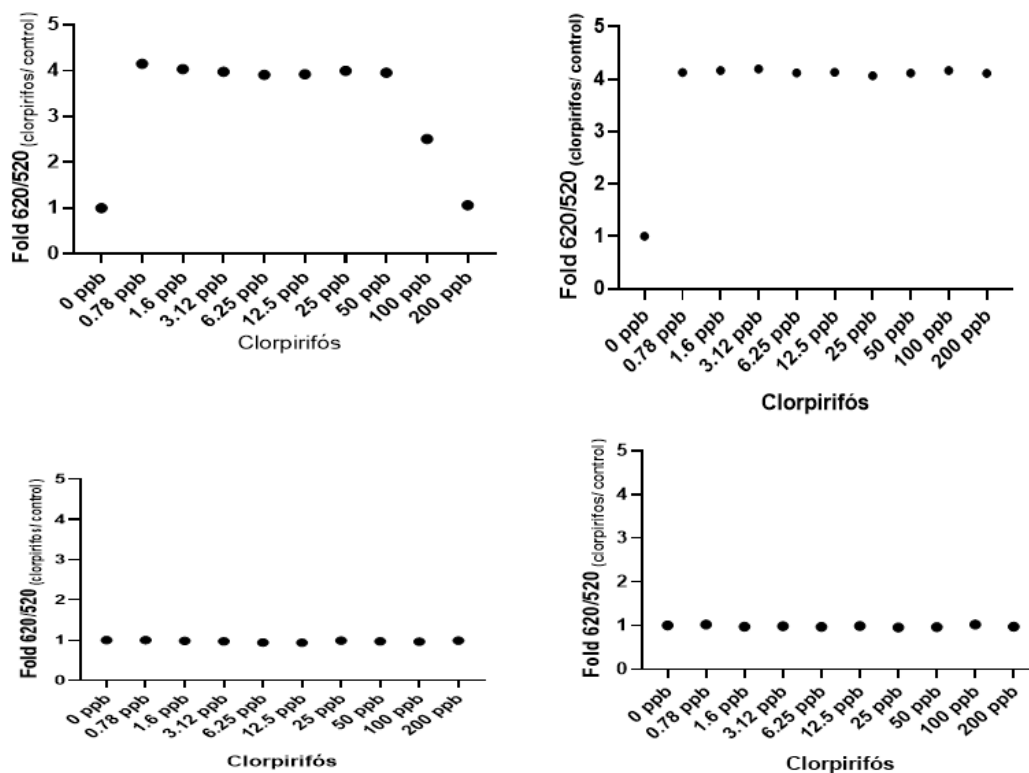


Figura 19. Determinación de la relación A₆₂₀/A₅₂₀ de las NAS 1:20. Se muestra la relación A₆₂₀/A₅₂₀ para la identificación y evaluación del comportamiento óptico con respecto a las concentraciones de clorpirifós. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

En la Figura 19 se observó el comportamiento del NAS 1:20 a través del seguimiento de la relación A₆₂₀/A₅₂₀ con respecto a la concentración detectable para clorpirifós entre los 0,78-200 ppb por el aumento de la fuerza iónica, se indican los valores de cada medición en presencia de CP calculadas restando el valor de las mediciones en ausencia de Clorpirifós expresado como Fold 620/520_(clorpirifós/control), los resultados sugieren la sensibilidad NAS 1:20 a la presencia de clorpirifós evidenciado por el proceso de agregación con respecto al cero y una tendencia con respecto a la concentración, sin embargo para concentraciones mayores a 50 ppb el NAS evitaría la agregación en condiciones de 1 M de sal, para la condición experimental a 1,5 M de NaCl, el NAS mostró un sensibilidad a la presencia de clorpirifós dentro del rango entre los 0,78- 200 ppb con respecto al NAS en ausencia de clorpirifós. Para los ensayos de adición de solución salina a 2 y 3 M de NaCl el NAS presenta reactividad, pero no selectiva en presencia y ausencia de clorpirifós.

Basado en los resultados obtenidos se continúa utilizando como revelador solución de NaCl a concentración 1,5 M. Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto del pH en la capacidad de detección de NAS 1:20 (Jiao *et al.*, 2017; Ehzari *et al.*, 2022).

3. Determinación de los parámetros de funcionamiento del aptasensor: pH

Se evaluó los parámetros químicos para el correcto funcionamiento del nanoaptasensor (NAS) para clorpirifós para el rango entre los 6,5 a 7,4 de pH como parámetro de funcionamiento.

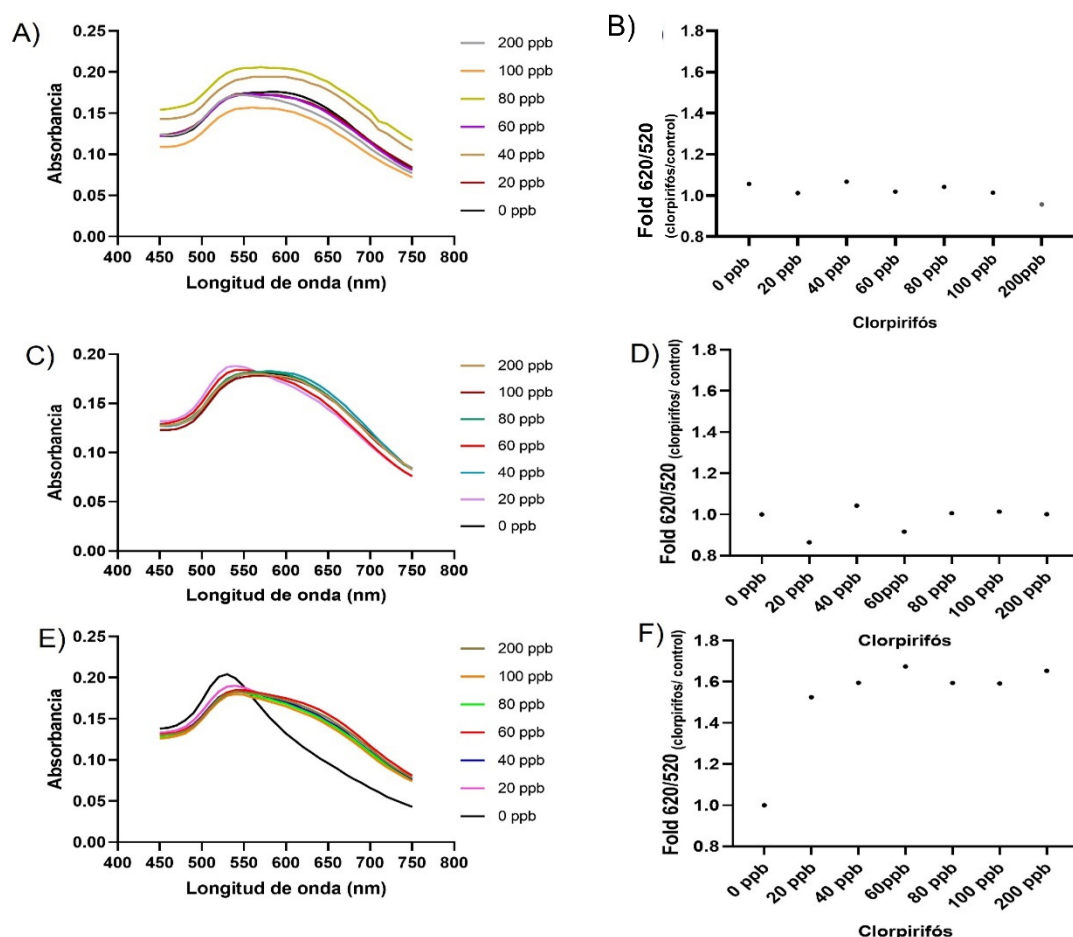


Figura 20. Efecto del pH en la detección de clorpirifós por el NAS 1:20. Se muestra los espectros de absorción obtenidos para la detección de clorpirifós utilizando NAS 1:20 a pH 7,4 (A), 7,1(C) y 6,5 (E) junto con el procesamiento de datos por la relación A_{620}/A_{520} (B, D y F, respectivamente), para el seguimiento de la agregación de los NAS. Se muestra el resultado de una medición (n=1).

Para determinar los parámetros de funcionamiento del NAS 1:20. Se realizó la detección de clorpirifós, variando el pH final de la mezcla de reacción, tal como se expresa en la sección materiales y métodos (Jiao *et al.*, 2017)

Los resultados de funcionamiento del NAS a pH 7,4 no se observó una relación entre los cambios ópticos y las diferentes concentraciones de utilizadas de clorpirifós (Figura 20 A y B). Con respecto a la condición de pH 7,1 tampoco se observó una relación entre los cambios ópticos y las diferentes concentraciones de clorpirifós disuelto (Figura 20 C y D). Finalmente, los resultados muestran un cambio de agregación de las AuNPs inducida por NaCl en presencia de Clorpirifós (Figura 20 E y F), observándose un aumento en la señal (A_{620}/A_{520}) de 1,6 veces con respecto al control.

En base a los resultados obtenidos se plantea continuar con los parámetros bioanalíticos para la detección de clorpirifós, NAS 1:20, a un pH final de 6.5 y solución reveladora de NaCl 1,5 M.

Evaluación del reconocimiento de clorpirifós por el aptámero

Utilizando los parámetros establecidos para el funcionamiento de NAS1:20, se realizó la detección de clorpirifós, buscando determinar si existe diferencias estadísticas asociadas a la detección de clorpirifós.

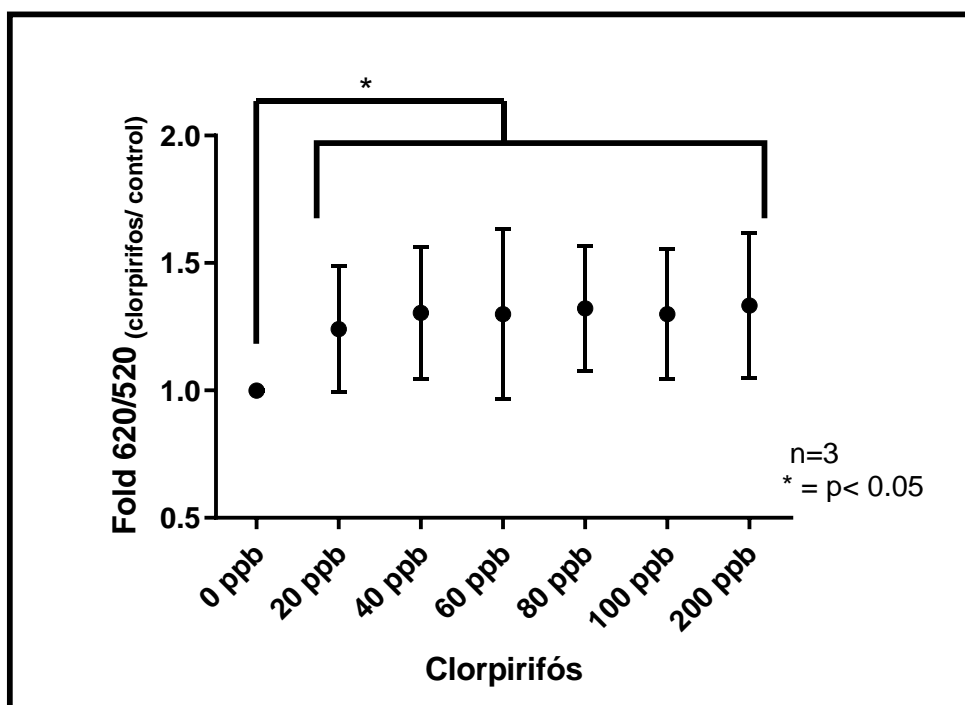


Figura 21. Detección colorimétrica de Clorpirifós en agua basada en la relación A620/A520. Se observa relación de absorción de las AuNPs funcionalizadas. Los resultados se promedian a partir de tres experimentos independientes ($n = 3$). Los datos se analizaron mediante una prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y los controles. $* = p < 0,05$.

En la figura 21 se observa la detección colorimétrica para clorpirifós disuelto en agua a pH 6,5 y 1,5 M de NaCl a partir de la relación de absorción A_{620}/A_{520} . Los datos se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. entre los grupos (concentraciones de clorpirifós). Los resultados sugieren que el NAS es reactivo a clorpirifós y que tiene la capacidad de detectar al plaguicida a partir una concentración de 20 ppb, es decir, una detección menor a la ingesta diaria permisible (30 ppb) de clorpirifós en agua.

Capítulo 5

DISCUSIÓN

Actualmente se han desarrollado biosensores para detectar contaminantes desde matrices medioambientales, se presentan como una prometedora herramienta para el seguimiento de la descarga de contaminantes en terreno. Pero, se desconoce si la degradación natural de dichos compuestos afectaría el correcto reconocimiento por parte de los biosensores, influyendo en su uso como herramienta de trazabilidad (Torres *et al.*, 2021).

Clorpirifós es un plaguicida utilizado ampliamente en la agricultura, con efectos tóxicos y cuya descarga al medio ambiente es importante monitorear para ejercer acciones conducentes a la regulación de su uso. Pero, los factores ambientales favorecen la degradación de CP y disipación en el medio ambiente, dificultando su trazabilidad y detección real en las diversas matrices (Torres *et al.*, 2021). Como ejemplo, Hossain y colaboradores (2013) indicaron que el porcentaje de fotodegradación para CP en agua destilada fue de 33,5% al cabo de 10 días expuesto a luz natural (Hossain *et al.*, 2013).

Por estos motivos este trabajo aborda de forma teórica si la degradación de este compuesto interfiere en su detección utilizando nanobiosensores para clorpirifós. Seguido de un estudio analítico para determinar los mejores parámetros de funcionamiento de un nanoaptasensor compuesto de AuNPs y aptámero para detectar clorpirifós en agua y en futuras colaboraciones de investigación comparar su capacidad de detección utilizando clorpirifós y clorpirifós oxón.

Se encuentran descritos biosensores para clorpirifós basados en distintos elementos biológico para el reconocimiento (Tabla 6)(Torres *et al.*, 2021).

Tabla 6 Revisión de elementos de reconocimiento biológico para Clorpirifós

Elemento de reconocimiento	Composición del biosensor	Mecanismo de detección	Rango lineal	Límite de Detección	Ref.
Enzimas	AgNPs	Amperometría	1.0×10^{-13} - 1×10^{-8} M	$1,8 \times 10^{-5}$ ppb	[91]
Enzimas	MOF / enzima AChE /AuNPs oro.	voltamperometría amperometría	10 - 100 ng / L.	0,0060 ppb	[92]
Enzimas	óxido de grafeno óxido reducido Circonio	Amperometría	0.1–10 ³ pM 1.0–10 ⁵ nM	$3,5 \times 10^{-5}$ ppb	[93]
Enzimas	óxido grafeno Reducido	Fotoelectroquímica	1.0–1000 µg L ⁻¹	1,0–1000 ppb	[91]
Enzimas	Grafeno puntos cuánticos CuFe ₂ O ₄ /magnético nanocristales de racimos	Fotoelectroquímica	1.0–10 ³ µg L ⁻¹	0,3 ppb	[94]
Enzimas	Nanotubo de carbono de paredes múltiples (MWCNTs)	Voltametría	0.001- 50 µg L ⁻¹	1,0 ppb	[95]
Enzimas	NPs Óxido de zinc	Voltametría	0.1–10 ³ pM	$1,752 \times 10^{-5}$ ppb	[96]
Enzimas	PB-modificado/SPE Co-ftalocianina y electrodos serigrafados modificados con azul de Prusia (SPE) Clorpirifos-metil oxon*	Amperometría	0.5–2 ppb	0,5 ppb	[97]
Enzimas	Electrodos de grafito*	Amperometría	-	0,1 ppb	[98]
Enzimas	Sensor basado en material compuesto de nanoestructura de carbono-quitosano	Voltametría	10^{-10} - 10^{-7} M	0,0554 ppb	[99]
Enzimas	Nanopartículas Platino	Amperometría	0.25-10 µg L ⁻¹	0,2 ppb	[100]
Enzimas	El biosensor de papel está incrustado con lipasa y palmitato de p-nitrofenol (PNPP)	Aplicación móvil Androide y análisis basado en PoC	0.1–1.0 mg L ⁻¹ .	65 ppb	[101]
Anticuerpos	BSA/anticlorpirifós /AuNPs/PANI/ MWCNTs/ CHIT/ GCE	Voltametría	0.1 - 1.0^5 ng mL ⁻¹	0.046 ppb	[102]

Anticuerpos	biosensor fluorescente inmunocromatográfico (NPs)	Fluorescencia	1 - 50 ppb	1.0 ppb	[7]
Anticuerpos	MWCNTs tiónina quitosano DPV	Voltametría	0.1-10 ⁻⁵ ppb	0.046 ppb	[102]
Anticuerpos	BSA-Ag/Pt/SiO ₂ /HRP-Ab	Amperometría	0.4-20 ng mL ⁻¹	22.6 ppb	[84]
Anticuerpos	QDs/ (cFLISA)	Fluorescencia	15.2–205.5 ng mL ⁻¹	8,4 ppb	[103]
anticuerpos	FET de grafeno	Potencial eléctrico	1,8 fM - 100 pM	6,3 x 10 ⁻⁷ ppb	[104]
ADN	dsCT/DNA/ePPy/PV S/ITO	Voltametría	0.0016-0.025 ppm	1,6 ppb	[105]
ADN	dsCT/DNA atrapamiento PANI/PVS/ITO	Voltametría	-	0,5 ppb	[106]
Reemplazo de Ligandos	CdTe/ QDs.	Fluorescencia	0.1 nM - 10 μM	~0,035	[107]
-	PATP / AuNPs	voltametría	-	115,69 ppb	[108]
Aptámeros	Ag-NanoZyme	Espectroscopia	35-210 ppm	11300 ppb	[109]
aptámeros	(QDs-AuNSs)	Fluorescencia	-	0,73 ppb	[110]
Aptámeros	Fc@MWCNTs/OMC /GCE	Voltametría	0.1-10 ⁵ ng mL ⁻¹	0,033 ppb	[28]
Aptámeros	Nanocompuesto CuO/ NFs-SWCNTs.	Voltametría	0.1 a 150 ng mL ⁻¹	0,07 ppb	[88]
Células	chpA/ ChpR/ <i>Escherichia coli</i> (FGE)/	Fluorescencia	25 - 500 nM	-	[111]

Los elementos de reconocimiento biológico para Clorpirifós revisados corresponde a las enzimas, anticuerpos, ácido nucleico, aptámeros y células enteras. Siendo los aptámeros los que presentarían importantes ventajas con respecto a los otros. (Tabla 7), por ejemplo, son más estables, presentan una mayor especificidad, una mayor vida útil y resistencia a la desnaturalación.

Tabla 7. Comparación de técnicas para la detección de clorpirifós en matrices ambientales

Aptámeros	Enzimas	Células	Anticuerpos	Ref.
Vida útil prolongada.	Vida útil limitada.	Vida útil limitada.	Alta constante de unión anticuerpo-analito.	[79]
Fácil modificación para mejorar su funcionalidad.	Respuesta rápida y variedad de enzimas.	Elevada actividad.	Vida útil limitada	[80]
Mayor estabilidad en comparación con los elementos biológicos.	Sensibilidad frente a condiciones fisiológicas	Respuesta lenta en comparación con las enzimas.	Sensibilidad y selectividad elevada.	[81]
Síntesis rápida en comparación con los anticuerpos.	Estabilidad limitada por parámetros fisicoquímicos.	Baja sensibilidad.	Dificultad para operar en medios acuosos.	[34]
Específico para cada analito.	Selectivo para una familia de compuestos.	Específico para una clase de compuesto.	En ocasiones requiere marcaje.	[82]
	Disponibilidad comercial.		Producción in vivo y se desnaturalizan	

De los nanobiosensores descritos para CP se destaca el estudio publicado este año por Liu (Liu *et al.*, 2022), el cual desarrollo un nanoaptasensor colorimétrico el cual permite detectar clorpirifós en agua potable con un límite de detección ~5 ppb. El mecanismo de detección se basa en recubrir las AuNPs con aptámeros específicos para CP mediante interacciones electroestáticas. De esta manera, en presencia de CP los aptámeros son secuestrados de la superficie de la AuNPs dejando desprotegida a las NPs favoreciendo la agregación de estas en presencia de NaCl. Permitiendo así seguir la concentración de CP a través la agregación diferenciada de las AuNPs como señal de su presencia de CP (Liu *et al.*, 2022).

Si bien este es un mecanismo de detección ampliamente utilizado (Hua *et al.*, 2021), la utilización de unión electroestática para la funcionalización puede traer problemas de especificidad, dado a los diversos compuestos con carga presente en matrices medio ambientales (Díaz-García *et al.*, 2022).

La funcionalización del nanoaptasensor propuesto en este trabajo está orientado a la unión a la AuNPs y el aptámero a través de enlace covalente que es un atributo analítico importante de estabilidad y que evita la inespecificidad a causa de interferentes ambientales, orgánicos e inorgánicos.

Este trabajo de tesis plantea un nanoaptasensor colorimétrico basado en AuNPs (0,08 nmoles) de tamaño 20 nm y aptámero (1,6 nmoles) específico para clorpirifós descrito por Jiao *et al.*, 2017, a diferencia de otras investigaciones el uso del grupo tiol de ssDNA (aptámero) unidos covalentemente a AuNPs (Au - S) proporciona una alta densidad superficial para prevenir la agregación inespecífica de las AuNPs (Díaz- García *et al.*, 2022), otro cambio importante en comparación con otros estudios es la preparación de las soluciones de clorpirifós disueltas en agua nanopura a pH 6,5 final y una concentración del agente revelador 1,5 M.

Parámetros analíticos de funcionalización de AuNPs.

Las condiciones de experimentación son trascendentales para desarrollar un aptasensor colorimétrico sensible, como la concentración de NaCl, el tiempo de incubación entre CP y el aptámero y el tiempo de incubación de NaCl. A diferencia de nuestro enfoque trabajos contemporáneos a la realización de esta investigación, Liu *et al.*, 2022 establece parámetros de funcionalización para un aptasensor colorimétrico (AuNPs) para una concentración de 0,07 M (70 mmol/L) de NaCl, tiempos de incubación entre el aptámero y las AuNPs de 30 minutos y tiempo de incubación óptimo de NaCl de 15 minutos, adicionalmente evalúa la relación A_{650}/A_{520} e indicando todas las condiciones se realizaron a temperatura ambiente y la utilización de nanopartículas de tamaño 13 nm.

Los parámetros de funcionamiento establecido en este trabajo se basan en variación inducidas en el medio por iones necesarios para provocar un cambio en la fuerza iónica, estableciéndose como concentración óptima de NaCl 1,5 M para provocar la agregación de las AuNPs y un posterior cambio SPR como resultado de la detección de clorpirifós. las variaciones inducidas por la sal para AuNPs se encuentra ampliamente descritas (Kim *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2018; Chawla *et al.*, 2018). En comparación con lo reportado por Liu *et al.*, 2022 en este estudio se utilizó un tiempo de incubación luego de agregar NaCl de 30 minutos y un tiempo de incubación para AuNPs-aptámero de 10 minutos.

En términos generales las condiciones ópticas para nanoaptasensor se estiman sobre su efecto en la estabilidad de las AuNPs funcionalizadas con el aptámero y se experimentan los factores que pueden interferir en el equilibrio cinético del NAS para la detección del CP como la concentraciones o cargas presentes en el sistema, disolvente utilizado, temperatura, pH, concentración de NaCl, concentraciones de CP que puedan provocar un cambio y una correcta reactividad y o sensibilidad del NAS para la detección de Clorpirifós. (Jiao et al.,2017; Liu *et al.*, 2022).

Otro de los parámetros de funcionamiento es el rol que cumple el pH en el desarrollo de biosensores, porque las variaciones de pH alteran la afinidad de unión y las repulsiones electroestáticas, por tanto, facilitan los cambios en la cobertura de las NPs y se puede evaluar a través de la intensidad del pico de absorbancia de las nanopartículas (Singh *et al.*, 2020).

Para los ensayos funcionalización de las AuNPs a pH 6,5 se observó una disminución de la intensidad de la banda característica de las AuNPs originado por la variación de las condiciones del medio o de la fuerza iónica y los cambios SPR expresado como el desplazamiento de la banda de absorción de ~520 nm a ~620 nm cuantificable por espectrofotometría (Tyner *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013), comprobando un reconocimiento de clorpirifós por el aptámero.

Entre los diversos biosensores basados en AuNPs, la biodetección colorimétrica ha captado ampliamente el interés por su simplicidad, bajo costo y cambios de color visibles, lo que puede considerarse como una alternativa para la detección *in situ*, los cambios de colores rojo-azul característico de las AuNPs presentan un cambio espontáneo y directo del espectro de absorción en el rango visible que se puede observar a simple vista al agregar NaCl (Qi *et al.*, 2020; Singha *et al.*, 2020).

Se requiere progresar y efectuar nuevos ensayos para los NAS, fundado en las diferencias en la reactividad de los NAS para las diferentes condiciones de

trabajo y proporciones molares asociadas ($n=1$) para valorar estadísticamente el efecto y grado de cobertura de los aptámeros sobre la superficie de AuNPs y en consecuencia los sitios reactivos favorables para clorpirifós (Díaz-García *et al.*, 2022).

Reconocimiento de clorpirifós por el aptámero

Los elementos de reconocimiento biológico como los aptámeros presentan atributos sobresalientes frente a los anticuerpos, células y enzimas para clorpirifós en términos de selectividad, reproducibilidad y estabilidad frente a factores ambientales para el monitoreo y detección, sin embargo, aún es un desafío analítico por explorar la selectividad de los aptámeros para clorpirifós frente a sus metabolitos en muestras reales.

El NAS 1:20 construido bajo las condiciones de pH 6,5 final y NaCl muestra que es útil para la detección de clorpirifós a partir de los 20 ppb, pero no permite una cuantificación del plaguicida bajo condiciones de laboratorio (Figura 21), por tanto el NAS permitiría entregar una respuesta analítica rápida, y sencilla de detección de contaminantes ambientales como el clorpirifós.

Simultáneamente a los ensayos de funcionamiento establecidos se caracterizó la vida útil de ambos biosensores (Figura 22 y 23) ,por ejemplo, el NAS 1:20 a 21 días de su preparación se mantiene estable la longitud de onda máx. característica de las AuNPs a los 520 nm lo que significaría la estabilidad de las AuNPs, sin embargo, NAS 1:10 a 21 días desde su preparación pierde estabilidad química, por tanto permite inferir que a mayor concentración de aptámero mayor es la estabilidad de las AuNPs.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

Se han descrito alrededor de 20 aptámeros para plaguicidas y los inconvenientes para detectar y cuantificar estos compuestos utilizando elementos de reconocimiento biológico se basa en que la mayoría de los plaguicidas tienen una estructura molecular pequeña, que dificulta su detección, también de diferenciar de otras moléculas de una misma familia química y de otros compuestos de naturaleza inorgánica y orgánica, además algunos plaguicidas carecen de grupos funcionales para su inmovilización, dificultando la capacidad de unión de los aptámeros potenciales, a través del método SELEX (Phopin *et al.*, 2020).

Se han evaluado los factores que repercuten en el proceso de agregación inducido por una sal (NaCl) y se ha comprobado que está fuertemente influenciado por la fuerza iónica del medio y por la propia concentración AuNPs. También se ha reportado que conforme aumenta el tamaño de la nanopartícula la estabilidad de la disolución coloidal frente a la agregación inducida por sal decrece (Mehrdel *et al.*, 2022).

Mediante la funcionalización de AuNPs con aptámero para Clorpirifós se logró detectar, pero no cuantificar el plaguicida lo que significa un avance importante desde el punto de vista de la detección colorimétrica in situ y también desde el punto de vista analítico, es decir sensible para la detección de CP.

El nanoaptasensor 1:20 es capaz de detectar a Clorpirifós, a rangos de concentración mayores a los reportados por el grupo de Liu, Zhang y Jiao, sin embargo, representa un avance importante para el desarrollo de nuevas tecnologías más simples, de bajo costo y de mejor sensibilidad analítica con respecto a los métodos clásicos de cromatografía.

Los objetivos específicos logrados en este trabajo es la síntesis y caracterización del nanoaptasensor (NAS) para la detección de Clorpirifós y establecer los parámetros analíticos del (NAS) para Clorpirifós.

Los objetivos específicos de reconstitución de muestras ambientales para comprobar el funcionamiento del nanoaptasensor en muestras reales y análisis comparativos con los métodos de cromatografía no fueron realizados en esta tesis.

El objetivo de comparar la sensibilidad de NAS para Clorpirifós y sus metabolitos no fue realiza en este trabajo de tesis.

Hay que señalar que es importante continuar con este trabajo de investigación y verificar el funcionamiento del NAS desde el punto de vista estadístico, además de confirmar si el aptámero tiene la capacidad de diferenciar a clorpirifós entre sus homólogos y metabolitos.

Se fundamenta en la necesidad de medir concentraciones a nivel traza de moléculas activas o productos de degradación en matrices complejas y variables, de importancia en salud pública y analítica desde el punto de vista de disminuir los tiempos de análisis y pretratamiento, sin embargo, aún es inevitable realizar tratamiento previo efectivos en los procedimientos para eliminar los interferentes de la matriz.

Desde el punto de vista del monitoreo ambiental la atención esta puesta en las técnicas de biosensores para la detección de CP y otros compuestos en la generación de protocolos estandarizados de análisis y detección respecto a los métodos clásicos.

La complejidad de detección de residuos para CP en muestras de aguas de consumo y sus productos de transformación es una de las limitaciones más importante para su identificación ambiental y un desafío para la detección colorimétrica del contaminante basado en AuNPs.

Finalmente, no todos los biosensores permiten detectar clorpirifós en las concentraciones que se requiere en matrices acuosas y que permita su caracterización de acuerdo con las normas internacionales vigentes.

RECOMENDACIONES

En este trabajo de tesis se evaluaron los parámetros de salinidad y alcalinidad para la solución coloidal de AuNPs funcionalizadas con aptámero específico

para clorpirifós descrito en bibliografía. En base a los resultados obtenidos es necesario evaluar la relación aptámero / AuNPs, parámetro no estimado en este trabajo de tesis, y que significa un parámetro importante para la correcta funcionalización del nanoaptasensor (NAS).

Realizar ensayos para la detección de los metabolitos de clorpirifós (TCP) en agua, porque presenta mayor solubilidad con respecto al CP, y por tanto representan mayor estabilidad ambiental para su detección.

Como el clorpirifós es considerado una sustancia química peligrosa sujeto a regulaciones ambientales y presenta persistencia bajo ciertas condiciones que favorecen su presencia en el medio ambiente, así también bajo condiciones químicas y biológicas que favorecen su degradación en un compuesto de gran interés en la comunidad científica su detección, cuantificación, estudio de movilidad, degradación en el medio ambiente, efectos adversos en el medio ambiente y salud humana que se evidencia en los numerosos trabajos de detección a través de Biosensores y técnicas tradicionales.

Perspectivas futuras

El desarrollo de esta tesis fue suspendido por la pandemia mundial de Covid 19, para responder a la pregunta de investigación se estima colaborar y participar en congresos con los ensayos utilizando el metabolito oxón bajo las mismas condiciones realizadas para el compuesto precursor, con el fin de evaluar la capacidad de las AuNPs funcionalizadas con aptámero CP de diferenciar entre ambos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Rotimi SO, Abam E, Okediran BS, Dosumu OA, Onunkwor BO. (2007). Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environ Toxicol Pharmacol.* (2):183-8. doi: 10.1016/j.etap.2007.05.002.
- Ali, M., Majid, M., Hussain, I., Kali, S., Naz, T., Niazi, M. B., & Zafar, M. I. (2020). Chlorpyrifos mediated oxidative damage and histopathological alterations in freshwater fish *Oncorhynchus mykiss* in Northern Pakistan. *Aquaculture Research*, 51(11), 4583-4594.
- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Latì, M.A. (2017) Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review, *Journal of Physics: Condensed Matter* 29(20): 203002
- Akhtar S., Talat, S., Gilani, S., Hasan, N. (2004). Persistence of chlorpyrifos and fenprothrin alone and in combination with fertilizers in soil and their effect on soil microbes. *Pakistan Journal of Botany*. 36, pp 863-870.
- Andreescu, S., Barthelmebs, L., & Marty, J. (2002). Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 464, 171-180.
- Andreu, V. & Pico, Y. (2004). Determination of Pesticides and their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 23. 772-789. 10.1016/j.trac.2004.07.008.
- Arduini F, Ricci F, Tuta CS, Moscone D, Amine A, Palleschi G. (2006). Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. *Anal Chim Acta* 580(2):155-62. doi: 10.1016/j.aca.2006.07.052.
- Arduini, F., Cinti, S., Scognamiglio, V., & Moscone, D. (2020). Nanomaterial-based sensors. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, 329–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00013-X>
- Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., García-Río L., (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol 123 (4), 247-260 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>.
- Bala R., Dhingra S., Kumar m., Bansal K., Mittal S, Sharma r., Wangoo N., (2017). Detection of organophosphorus pesticide - Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobe, *Chemical Engineering Journal*. Vol 311, pp. 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.070>.
- Baldini, F., Minunni, M. (2019). New developments in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 411, 7605–7606 <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02232-z>

- Baez, M., Espinoza, J., Silva, R.(2015). Sorption-desorption behavior of pesticides and their degradation products in volcanic and nonvolcanic soils: interpretation of interactions through two-way principal component analysis". *Environ sci pollut res* 22, pp, 8576–8585 . <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4036-8>.
- Bhanti M.&Taneja, A.(2007) Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India, *Chemosphere* 69:63-68.
- Bellas, Juan & Gil Luna, Irene. (2020). Polyethylene microplastics increase the toxicity of chlorpyrifos to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Pollution*. 260. 114059. 10.1016/j.envpol.2020.114059.
- Belfroid, A. C., Van Drunen, M., Beek, M. A., Schrap, S. M., Van Gestel, C. A. M., & Van Hattum, B. (1998). Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 222(3), 167-183.
- Borrás, E., Ródenas M., Vázquez-Moreno, M. Vera, T.Muñoz, A. (2015). Particulate and gas-phase products from the atmospheric degradation of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon. *Atmospheric Environment*. 123. 10.1016/j.atmosenv.2015.10.049.
- Bigot, M; Muir, DC; Hawker, DW; Cropp, R; Dachs, J; Teixeira, CF; Bengtson Nash, S.(2016). Air-Seawater Exchange of Organochlorine Pesticides in the Southern Ocean between Australia and Antarctica, *Environmental Science and Technology* 50(15): 8001-8009.
- Brusseau M.L., J.F. Artiola, (2019).Chapter 12 - Chemical Contaminants, Editor(s): Mark L. Brusseau, Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, *Environmental and Pollution Science (Third Edition)*, Academic Press, pp.175-190,
- Bucur, B., Munteanu, F. D., Marty, J. L., & Vasilescu, A. (2018). Advances in Enzyme-Based Biosensors for Pesticide Detection. *Biosensors*, 8(2), 27. <https://doi.org/10.3390/bios8020027>.
- Cao, Jing & Wang, Miao & She, Yongxin & Hacimuftuoglu, Ahmet & Wang, Jing & Yan, Mengmeng & Hong, Sihui & Lao, Shuibing & Wang, Yanli. (2019). Rapid colorimetric determination of the pesticides carbofuran and dichlorvos by exploiting their inhibitory effect on the aggregation of peroxidase-mimicking platinum nanoparticles. *Microchimica Acta*. 186. 10.1007/s00604-019-3485-7.
- Capoferri D, Della Pelle F, Del Carlo M.(2018).Compagnone D. Affinity Sensing Strategies for the Detection of Pesticides in Food. *Foods*.7(9):148. doi: 10.3390/foods7090148.
- Caramello, C.S., Cowper, C.F., Jorge, M.J., Pérez, J.E., & Jorge, L.C. (2019). Anormalidades morfológicas nucleares en hematíes del pez *Prochilodus linneatus* expuesto al clorpirifós. *Revista veterinaria*, 30(2), 64-72. <https://dx.doi.org/10.30972/vet.3024136>
- Cavoski, I., Caboni, P., Sarais, G., & Miano, T. (2008). Degradation and Persistence of Rotenone in Soils and Influence of Temperature Variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8066–8073. <https://doi.org/10.1021/JF801461H>.

- Citartan M, Tang TH. (2019). Recent developments of aptasensors expedient for point-of-care (POC) diagnostics. *Talanta*, 1(199)556-566. doi: 10.1016/j.talanta.2019.02.066.
- Coscollà, C., Muñoz, A., Borrás E., Vera T., Ródenas M., Yusa V. (2014). Particle size distributions of currently used pesticides in ambient air of an agricultural Mediterranean area. *Atmospheric Environment*. 95. 29. 10.1016/j.atmosenv.2014.06.022.
- Chai L.K., Wong M.H, Bruun Hansen H.C.(2013). Degradation of chlorpyrifos in humid tropical soils, *Journal of Environmental Management*,125:28-32. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.005>.
- Chawla P., Kaushik R., Shiva Swaraj V.J., Kumar N.(2018) Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, Vol. 10,292-307 <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.07.013>
- Chen, H-Qi., - Yuan, F., Wang, L.(2013). Simple and sensitive turn-on luminescent detection of biothiols based on energy transfer between green-emitting upconversion nanocrystals and gold nanoparticles. *Analytical Methods* (5),2873–2879. <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY40105G>.
- Chen, Yi & Ning, Baoan & Liu, Nan & Feng, Yi & Liu, Zhen & Liu, Xiaoyu & Gao, Zhi. (2010). A rapid and sensitive fluoroimmunoassay based on quantum dot for the detection of chlorpyrifos residue in drinking water. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 45. 508-15. 10.1080/03601234.2010.493476.
- Contreras-Trigo B, Díaz-García V, Guzmán-Gutierrez E, Sanhueza I, Coelho P, Godoy SE, Torres S, Oyarzún P. (2018). Slight pH Fluctuations in the Gold Nanoparticle Synthesis Process Influence the Performance of the Citrate Reduction Method. *Sensors* 18(7):2246. <https://doi.org/10.3390/s18072246>.
- Cortes S., Pozo K., Llanos Y., Martinez N., Foerster C., Leiva C., Ustáriz J., Přebýlová P., Klánová J., Jorquera H.(2020) First measurement of human exposure to current use pesticides (CUPs) in the atmosphere of central Chile: The case study of Mauco cohort, *Atmospheric Pollution Research*,11,(4):776-784.
- Coupe, R. & Blomquist, J.(2004). Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies. *Journal American Water Works Association* (96). 56-68.DOI: 10.1002/j.1551-8833.2004.tb10723.x.
- Cui S., Hough R., Yates K., Osprey M., Kerr C., Cooper P., Coull M., Zhang Z.,(2020) Effects of season and sediment-water exchange processes on the partitioning of pesticides in the catchment environment: Implications for pesticides monitoring, *Science of The Total Environment*, Vol. 698,134228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134228>.
- Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska-seget Z.(2009) “Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil, *Chemosphere*, Vol. 76(4)494–501 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.023>.

- Climent, M.J., Herrero-Hernández, E., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., Pedreros, P., Urrutia, R. (2019). Residues of pesticides and some metabolites in dissolved and particulate phase in surface stream water of Cachapoal River basin, central Chile. *Environmental Pollution* 251: 90-101.
- Cruzeiro, C., Pardal, M., Rocha E., Rocha, M. (2015). Occurrence and seasonal loads of pesticides in surface water and suspended particulate matter from a wetland of worldwide interest—the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187. 10.1007/s10661-015-4824-8.
- Dar MA, Kaushik G, Villarreal-Chiu JF.(2019).Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review. *J Environ Manage* 239:124-136. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.048.
- Díaz-García, Víctor, Braulio Contreras-Trigo, Camila Rodríguez, Pablo Coelho, and Patricio Oyarzún. 2022. "A Simple Yet Effective Preanalytical Strategy Enabling the Application of Aptamer-Conjugated Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Antibiotic Residues in Raw Milk" *Sensors* 22, no. 3: 1281. <https://doi.org/10.3390/s22031281>.
- Di Nardo, F., & Anfossi, L. (2020). Commercial biosensors for detection of food additives, contaminants, and pathogens.
- Duhan, J.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur P., Nehra, K. Duhan, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agricultura, *Biotechnology Reports* 15:11-17.
- Ejeian F., Etedali P., Mansouri-Tehrani H.A, Soozanipour A., Low Z., Asadnia M., Taheri-Kafrani A., Razmjou A. (2018). Biosensors for wastewater monitoring: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 118:66-79.
- Estellano VH, Pozo K, Efstathiou C, et al. Assessing levels and seasonal variations of current-use pesticides (CUPs) in the Tuscan atmosphere, Italy, using polyurethane foam disks (PUF) passive air samplers.(2015) *Environmental Pollution* 205:52-59. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.05.002. PMID: 26005863.
- Ehzari H., Safari M., Samimi M., Shamsipur M., Gholivand M.G.,(2022).A highly sensitive electrochemical biosensor for chlorpyrifos pesticide detection using the adsorbent nanomatrix contain the human serum albumin and the Pd:CdTe quantum dots, *Microchemical Journal*, Vol. 179-107424 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107424>
- FAO & WHO. Pesticide specifications (2016) Manual on development and use of fao and who specifications for pesticides second revision available only on the internet, First edition - third revision" ISSN 0259-2517.
- Feng, Shaolong & Hu, Yaxi & Ma, Luyao & Lu, Xiaonan. (2016). Development of Molecularly Imprinted Polymers-Surface-Enhanced Raman Spectroscopy/Colorimetric Dual Sensor for Determination of Chlorpyrifos in Apple Juice. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 241. 10.1016/j.snb.2016.10.131.

- Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* 241, 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- George, N., Chauhan, P. S., Sondhi, S., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Biodegradation and analytical methods for detection of organophosphorous pesticide: chlorpyrifos. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 79.
- Giddings, J.M., Williams, W.M., Solomon, K.R., Giesy, J.P. (2014). Risks to Aquatic Organisms from Use of Chlorpyrifos in the United States. In: Giesy, J., Solomon, K. (eds) *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol 231. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_5
- Guler, M., Turkoglu, V., & Basi, Z. (2017). Determination of malation, methidathion, and chlorpyrifos ethyl pesticides using acetylcholinesterase biosensor based on Nafion/Ag@ rGO-NH₂ nanocomposites. *Electrochimica Acta*, 240, 129-135.
- Gutiérrez, P., Godoy S., Torres S., Oyarzún P., Sanhueza I., Díaz-García, V., Contreras-Trigo B. and Coelho P. (2020). Improved Antibiotic Detection in Raw Milk Using Machine Learning Tools over the Absorption Spectra of a Problem-Specific Nanobiosensor, *Sensors* 20(16): 4552.
- Halamek, Josef & Pribyl, Jan & Makower, A & Skládal, Petr & Scheller, F. (2005). Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 382. 1904-11. 10.1007/s00216-005-3260-y.
- Han Y, Mo R, Yuan X, Zhong D, Tang F, Ye C, Liu Y. (2017). Pesticide residues in nut-planted soils of China and their relationship between nut/soil. *Chemosphere*. 180:42-47. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.138
- Hossain M.S., Fakhruddin A.N.M, Alamgir Zaman Chowdhury M., Khorshed Alam M. (2013). Degradation of chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide in aqueous solution with gamma irradiation and natural sunlight, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1, (3):270-274. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.05.006>.
- Hua Z., Yu T, Liu D., Xianyu Y., (2021) Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 179, 113076, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113076>.
- Hu D., Jiang M., Ge T., Liu X., Li Z., Liu J., Zhu K. (2020) Pesticide residues in vegetables in four regions of Jilin Province, *International Journal of Food Properties*, 23:1, 1150-1157, DOI: 10.1080/10942912.2020.1784197.
- Ion, I., Culetu, A., Gherase, D., Sirbu, F., & Ion, A. C. (2014). Environmental applications of carbon-based nanomaterials. Acetylcholinesterase biosensors for organophosphate pesticide analysis. *New Applications of Nanomaterials*. Bucharest: Academiei Române, 33-51.
- Instituto de Investigaciones Agropecuarias (2017), Boletín INIA N° 348," pp. 22–23.

- Islam, S., Shukla, S., Bajpai, V.K., Han Y.K., Suk hun Y., Adinram G., Gandhi S. (2019). Microfluidic-based graphene field effect transistor for femtomolar detection of chlorpyrifos. *Sci Rep* 9, 276 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36746-w>
- Jakmunee, J., Omer S.A., Fakhre, N. A. (2020) Simultaneous Determination of Ternary Mixture of Carboxin, Chlorpyrifos, and Tebuconazole Residues in Cabbage Samples Using Three Spectrophotometric Methods, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*:4912762
- Jiao, Y., Hou, W., Fu, J., Guo, Y., Sun, X., Wang, X., & Zhao, J. (2017). A nanostructure, red electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of chlorpyrifos. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 1164-1170.
- John, E.M., & Shaik, J.M. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13, 269-291. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7>
- Justino, C. I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. (2017). Recent progress in biosensors for environmental monitoring: a review. *Sensors*, 17(12), 2918.
- Lerch, R., Lin, C-H., Goyne, K., Kremer R. & Stephen A. (2017). Vegetative Buffer Strips for Reducing Herbicide Transport in Runoff: Effects of Buffer Width, Vegetation, and Season. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*. 53. 667-683. 10.1111/1752-1688.12526.
- Li, F., Yu, Z., Han, X., & Lai, R. Y. (2019). Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1051, 1-23.
- Liu, S., Zheng, Z. & Li, X. (2013). Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Anal Bioanal Chem* 405, 63–90. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6299-6>.
- Liu, J., Guan, Z., Lv, Z., Jiang, X., Yang, S., & Chen, A. (2014). Improving sensitivity of gold nanoparticle based fluorescence quenching and colorimetric aptasensor by using water resuspended gold nanoparticle. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 265-270.
- Liu, M., Khan, A., Wang, Z., Liu, Y., Yang, G., Deng, Y., & He, N. (2019). Aptasensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 174-184.
- Liu, J., Kong, D., Liu, Z., Liu, H., Yi, J., Tian, D., Jia, F., Zhou, C. (2020). Three-dimensional mesoporous dendritic fibrous nanosilica as a highly efficient DNA amplification platform for ultrasens, *Sensors and Actuators B: Chemical* 319: 128246.
- Lockridge O., Verdier ., Schopfer L. (2019) Half-life of chlorpyrifos oxon and other organophosphorus esters in aqueous solution, *Chemico-Biological Interactions* 311: 108788. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.108788.
- Luo Q., Yu F., Yang F., Yang C., Qiu O., Wang X. (2018) A 3D-printed self-propelled, highly sensitive mini-motor for underwater pesticide detection, *Talanta*, 183:297-303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.059>.
- Luo Z., Zhang J., Wang J., Chen J., Li Y., Duan Y. (2016) An aptamer based method for small molecules detection through monitoring salt-induced AuNPs

aggregation and surface plasmon resonance (SPR) detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 236:474-479.

- Makino Y., Oshita S., Murayama Y., Mori M., Kawagoe Y., Sakai K. (2009). Nondestructive analysis of chlorpyrifos on apple skin using uv reflectance, *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, Vol. 52(6): 1955-1960.
- Md Meftaul I, Venkateswarlu K, Dharmarajan R, Annamalai P, Megharaj M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Sci Total Environ*. 711:134612. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.13461.
- Mahmoud N., S. Mohammad S., Mohaddeseh S., Zahra I. (2019). Chapter 4 - Applications of Nanotechnology in Daily Life, Editor(s): Mahmoud N., S. Mohammad S., Mohaddeseh S., Zahra I., Monireh A., *Interface Science and Technology*, Elsevier, Vol. 28, 113-143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00004-3>.
- Marchis, D., Ferro, G. L., Brizio, P., Squadrone, S., & Abete, M. C. (2012). Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. *Food Control*, 25(1), 270–273. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.10.055>
- Masiá A., Campo J., Navarro-Ortega A., Barceló D., Picó Y. (2015) Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data, *Science of The Total Environment*, 503–504, :58-68 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095>.
- Mathur H. B., Agarwal H. C., Johnson S., and Saikia N. (2005) Analysis of pesticide residues in blood samples from villages of punjab investigators cse report: analysis of pesticide residues in blood samples from villages of punjab ,centre for science and environment, 21:1-24.
- Mao Y., Fan T., Gysbers R., Tan Y., Liu F., Lin S., Jiang Y. (2017). A simple and sensitive aptasensor for colorimetric detection of adenosine triphosphate based on unmodified gold nanoparticles, *Talanta*, 168:279-285. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.014>.
- Mane, P.C., Shinde, M.D., Varma, S. et al. (2020). Highly sensitive label-free bio-interfacial colorimetric sensor based on silk fibroin-gold nanocomposite for facile detection of chlorpyrifos pesticide. *Sci Rep* 10, 4198. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61130-y>.
- Mogha, N. K., Sahu, V., Sharma, M., Sharma, R. K., & Masram, D. T. (2016). Biocompatible ZrO₂-reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection. *Materials & Design*, 111, 312-320.
- Mehrdel B., A. Aziz, T. Yoon, and S. Lee. (2017). "Effect of chemical interface damping and aggregation size of bare gold nanoparticles in NaCl on the plasmon resonance damping," *Opt. Mater. Express* 7, 955-966
- Mosquera RB, Peñuela GA. (2009). Biodegradación de malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 22: 189-198.

- Muñoz A, Ródenas M, Borrás E, Vázquez M, Vera T.(2014).The gas-phase degradation of Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon towards OH radical under atmospheric conditions. *Chemosphere* 111:522-8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.087.
- Murray KE, Thomas SM, Bodour AA. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut.* (12):3462-71. doi: 10.1016/j.envpol.2010.08.009
- Nagabooshanam, S., Roy, S., Mathur, A., Mukherjee I., Krishnamurthy S., Bharadwaj L.M. (2019). Electrochemical micro analytical device interfaced with portable potentiostat for rapid detection of chlorpyrifos using acetylcholinesterase conjugated metal organic framework using Internet of things. *Sci Rep* 9, 19862. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56510-y>
- Pozo K., Llanos Y., Estellano V.H., Cortés S., Jorquera H., Gerli L., Pozo K., Encina F., Palma R., Focardi S. (2016).Occurrence of chlorpyrifos in the atmosphere of the Araucanía Region in Chile using polyurethane foam-based passive air samplers, *Atmospheric Pollution Research*, Vol. 7(4):706-710. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2016.03.003>.
- Kaphle, A., Navya, P.N., Umapathi, A.,Daima H.K (2018). Nanomaterials for agriculture, food and environment: applications, toxicity and regulation. *Environ Chem Lett* 16, 43–58 <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0662-y>
- Kant R. (2019) Surface plasmon resonance based fiber-optic nanosensor for the pesticide fenitrothion utilizing Ta₂O₅ nanostructures sequestered onto a reduced graphene oxide matrix. *Mikrochim Acta* 187(1):8. doi: 10.1007/s00604-019-4002-8.
- Kathryn M. Mayer and Jason H. (2011). Localized Surface Plasmon Resonance Sensors *Hafner Chemical Reviews* 111 (6), 3828-3857.DOI: 10.1021/cr100313v.
- Kaur, N., & Prabhakar, N. (2017). Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 92, 62-85.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668-677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- Koukouvinos, Georgios & Petrou, Panagiota & Goustouridis, Dimitris & Misiakos, Konstantinos & Kakabakos, Sotirios & Raptis, Ioannis. (2017). Development and Bioanalytical Applications of a White Light Reflectance Spectroscopy Label-Free Sensing Platform. *Biosensors*. 7. 46. 10.3390/bios7040046.
- Kurt K., P.,Teixeira, C.,Small, J.,Muir D. & Terry B. (2011). Current-use pesticides in inland lake waters, precipitation, and air from Ontario, Canada. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*. 30. 1539-48. 10.1002/etc.545.
- Krishnendu S., Sarit S. Agasti, C. K., Xiaoning L., Rotello V.M. (2012). Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing,*Chemical Reviews* 112 (5), 2739-2779.DOI: 10.1021/cr2001178.

- Kyu-Won H.,Soo Y., Sung-Eun L.,Joon Kwan M. (2018). Residual Level of Chlorpyrifos in Lettuces Grown on Chlorpyrifos-Treated Soils. *Applied Sciences*. 8. 2343. 10.3390/app8122343.
- Kuswandi, B., Fikriyah, C. I., & Gani, A. A. (2008). An optical fiber biosensor for chlorpyrifos using a single sol–gel film containing acetylcholinesterase and bromothymol blue. *Talanta*, 74(4), 613–618. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2007.06.042>
- Pehkonen, S. O., & Zhang, Q. (2002). The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Critical reviews in environmental science and technology*, 32(1), 17-72.
- Phopin K, Tantimongcolwat T. (2020). Pesticide Aptasensors-State of the Art and Perspectives. *Sensors (Basel)* 20(23):6809. doi: 10.3390/s20236809.
- Pimm S. L.,Jenkins C. N., Abell R., Brooks T. M., Gittleman J. L.,Joppa L. N., Raven P. H., Roberts C. M., Sexton J. O. (2014).The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection, *American Association for the Advancement of Science* Vol.344, 6187. <https://doi.org/10.1126/science.1246752>.
- Pundir, C.S., Malik, A, Preety (2019) Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 140: 111348. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111348.
- Qi Y., Chen Y., Xiu F.R., Hou J. (2020) An aptamer-based colorimetric sensing of acetamiprid in environmental samples: Convenience, sensitivity and practicability,*Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol.304, 127359.<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127359>.
- Rassaei L., Marken F., Sillanpää M., Amiri M., Cirtiu C.M., Sillanpää M. (2011). Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring,*TrAC Trends in Analytical Chemistry*,30 (11):1704-1715.
- Rodríguez C., Carvajal D.,Peñuela, G. (2013). Effect of chlorpyrifos on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase by cross-linking in water-supply samples and milk from dairy cattle. *Talanta*, 111, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.036>
- Rathod AL, Garg RK. (2017) Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *J Forensic Leg Med*. 47:29-34. doi: 10.1016/j.jflm.2017.02.003.
- Röthlisberger P, Hollenstein M. (2018). Aptamer chemistry. *Adv Drug Deliv Rev*. 134:3-21. doi: 10.1016/j.addr.2018.04.007.
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical reviews*, 112(5), 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>
- Sanghi, R., Pillai, M. K., Jayalekshmi, T. R., & Nair, A. (2003). Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Human & experimental toxicology*, 22(2), 73-76.

- Rajat Singh, Preeti Thakur, Atul Thakur, Harish Kumar, Prince Chawla, Jigneshkumar V. Rohit, Ravinder Kaushik & Naveen Kumar (2021) Colorimetric sensing approaches of surface-modified gold and silver nanoparticles for detection of residual pesticides: a review, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 101:15, 3006-3022, DOI: 10.1080/03067319.2020.1715382
- Sankar, K., Lenisha, D., Janaki, G., Juliana, J., Kumar, R. S., Selvi, M. C., & Srinivasan, G. (2020). Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device. *Talanta*, 208, 120408.
- Silipunyo, T., Hongsibsong S., Phalaraksh, C., Laoyang, S., Kerdnoi, T., Patarasiriwong, V., Prapamontol, T. (2016). Determination of Organophosphate Pesticides Residues in Fruits, Vegetables and Health Risk Assessment Among Consumers in Chiang Mai Province, Northern Thailand. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 11. 20-27. 10.3923/rjet.2017.20.27.
- Su, K.-H.; Wei, Q.-H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. (2003). Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *American Chemical Society* 3(8), 1087–1090. <https://doi:10.1021/nl034197f>.
- Sun, X., Qiao, L., Sun, X., & Wang, X. (2013). Pesticide residues rapid detection in vegetables real samples based on nanomaterial-modified acetylcholinesterase biosensor. *Micro & Nano Letters*, 8(7), 330-335.
- Tankiewicz, M. (2019). Determination of Selected Priority Pesticides in High Water Fruits and Vegetables by Modified QuEChERS and GC-ECD with GC-MS/MS Confirmation. *Molecules*. 24. 417. 10.3390/molecules24030417.
- Tseng, W.B., Hsieh, M.M; Chen, C.H., Tai-Chia C.; Tseng, W.T (2020) "Functionalized gold nanoparticles for sensing of pesticides: A review," *Journal of Food and Drug Analysis: Vol. 28: Iss. 4, Article 4*.
- Turkevich, J.; Stevenson, P. C., Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society* (55)75. <http://dx.doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- Tyagi, H., Kushwaha, A., Kumar, A. et al. (2016). A Facile pH Controlled Citrate-Based Reduction Method for Gold Nanoparticle Synthesis at Room Temperature. *Nanoscale Res Lett* (1), 362. DOI.org/10.1186/s11671-016-1576-5.
- Uniyal S., Kumar Sharma S. (2018). Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of Organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects, *Biosensors and Bioelectronics* 116,37-50. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.039>.
- Unser S, Bruzas I, He J, Sagle L. (2015). Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors*. 15(7):15684-15716. <https://doi.org/10.3390/s150715684>.
- Verdian, A. (2018). Apta-nanosensors for detection and quantitative determination of acetamiprid - A pesticide residue in food and environment. *Talanta*, 176, 456-464.

- Vörösmarty, C., McIntyre, P., Gessner, M. et al. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09440>.
- Wang, F., Yao, J., Chen, H., Chen, K., Trebše, P., & Zaray, G. (2010). Comparative toxicity of chlorpyrifos and its oxon derivatives to soil microbial activity by combined methods. *Chemosphere*, 78(3):319–326. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.10.030>.
- Wang, X., Lu, X., & Chen, J. (2014). Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2, 25-32.
- Wang L., Liu Z., Zhang J., Wu Y, Sun H. (2016). “Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults: metabolic characteristic, exposure estimation, and potential effect of oxidative damage,” *environ* 149:164–170. DOI: 10.1016/j.envres.2016.05.011.
- Wang P., Lin Z., Su X., Tang Z. (2017) Application of Au based nanomaterials in analytical science, *Nano Today*, 12: 64-97.
- Weerathunge P., Ramanathan R., Torok V.A., Hodgson K., Xu Y., Goodacre R., Kumar Behera B., Bansal V. (2019) Ultrasensitive Colorimetric Detection of Murine Norovirus Using NanoZyme Aptasensor. *Analytical Chemistry* 91 (5), 3270-3276 DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03300.
- Wei, W., Zong, X., Wang, X., Yin, L., Pu, Y., & Liu, S. (2012). A disposable amperometric immunosensor for chlorpyrifos-methyl based on immunogen/platinum doped silica sol–gel film modified screen-printed carbon electrode. *Food Chemistry*, 135(3), 888–892. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.037>
- Wu, X., An, J. M., Shang, J., Huh, E., Qi, S., Lee, E., Li, H., Kim, G., Ma, H., Oh, M. S., Kim, D., & Yoon, J. (2020). A molecular approach to rationally constructing specific fluorogenic substrates for the detection of acetylcholinesterase activity in live cells, mice brains and tissues. *Chemical Science*, 11(41), 11285-11292. <https://doi.org/10.1039/d0sc04213g>
- Xu G, Huo D, Hou C, Zhao Y, Bao J, Yang M, Fa H. (2018). A regenerative and selective electrochemical aptasensor based on copper oxide nanoflowers-single walled carbon nanotubes nanocomposite for chlorpyrifos detection. *Talanta*. 1;178:1046-1052. doi: 10.1016/j.talanta.2017.08.086.
- Yao, Y., Wang, G., Chu, G., An, X., Guo, Y., Sun, X. (2019) The development of a novel biosensor based on gold nanocages/graphene oxide–chitosan modified acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide detection, *New J. Chem.* 43 :13816-13826 <http://dx.doi.org/10.1039/C9NJ02556A>.
- Yeshchenko, O.A., Dmitruk, I.M., Alexeenko, A.A., Kotko A.V., Verdal J., Pinchuk A. (2012). Size and Temperature Effects on the Surface Plasmon Resonance in Silver Nanoparticles. *Plasmonics* 7: 685–694. <https://doi.org/10.1007/s11468-012-9359-z>.
- Yousefi S, Saraji M. (2019). Optical aptasensor based on silver nanoparticles for the colorimetric detection of adenosine, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and*

Zhang C., Wang L., Tu Z., Sun X., He Q., Lei Z., Xu C., Liu Y., Zhang X., Yang J., Liu X., Xu Y. (2014). Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded dna based fluorescence polarization aptamer assay *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 55, 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.020>.

Zhang Q, Zheng S, Wang S, Wang W, Xing H, Xu S. (2019). Chlorpyrifos induced oxidative stress to promote apoptosis and autophagy through the regulation of miR-19a-AMPK axis in common carp. *Fish Shellfish Immunol* (93) 1093-1099. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.022>.

Zhang, M., Xu, Z., Teng, Y., Christie, P., Wang, J., Ren, W., & Li, Z. (2016). Non-target effects of repeated chlorothalonil application on soil nitrogen cycling: the key functional

1. Anexos

Tabla 8 Tabla. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifós

Propiedades físicas y químicas del clorpirifós (de Yadav *et al.*, 2016; Dar, *et al.*, 2019; Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL 2012) Adoptado y modificado.

Características	Valores
Nombre ISO	Clorpirifós
Nombre IUPAC	O, O-dietil O-3, 5,6-tricloropiridina-2-ilo- Fosforotioato
Nº registro CAS	2921-88-2
Formula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Familia química	Organofosforado
Peso molecular	350.6 g/mol
Presión de vapor	1.8 × 10 ⁻⁵ mm Hg at 25 °C
solubilidad	1.05 mg/l a 20°C 2 mg/l a 25 °C
Coefficientes de partición	Log Kow 4.96 - 5.11 Log Koc 3.78
Punto de Fusión	41,5-44 °C
Estabilidad	Estable en el aire, No sensible a las radiaciones UV Estable en soluciones débilmente ácidas y neutras Se hidrolizado por bases fuertes
Metabolitos principales	3,5,6-tricloro-2-piridinol, (TCP)

	3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) Ácido O-etil-O- (3,5,6-tricloro-2-piridoil) fosforotioico (fosforotioato) Clorpirifós oxon
Uso	insecticida
Clasificación toxicológica	Clase II
Efectos agudos sobre organismos de agua y peces	LC ₅₀ 96 horas pez de agua dulce (<i>Poecilia reticulata</i>): 0.1 – 1,0 mg/l producto muy tóxico para organismos acuáticos
Compuesto de origen	sintético

Ensayos realizados para reformar los conceptos de funcionalización de las AuNPs con aptámero específico para Clorpirifós.

Evaluación de la vida media de los Biosensores

Con el objetivo de continuar con los ensayos de colorimetría para clorpirifós utilizando los NAS 1:10 y 1:20 se utiliza el criterio de estabilidad y/o vida media de las AuNPs funcionalizadas con el aptámero para clorpirifós bajo condiciones de almacenaje, para ello se prepararon concentraciones de clorpirifós y se mezclaron y fueron analizadas en un espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek. En la Figura 23 y 24 se observa los espectros de absorbancia para los nanoaptasensores (NAS) 1:10 y nanoaptasensor (NAS) 1:20 luego de 21 días almacenamiento desde su preparación en refrigerador a 5° C en el laboratorio de nanotecnología.

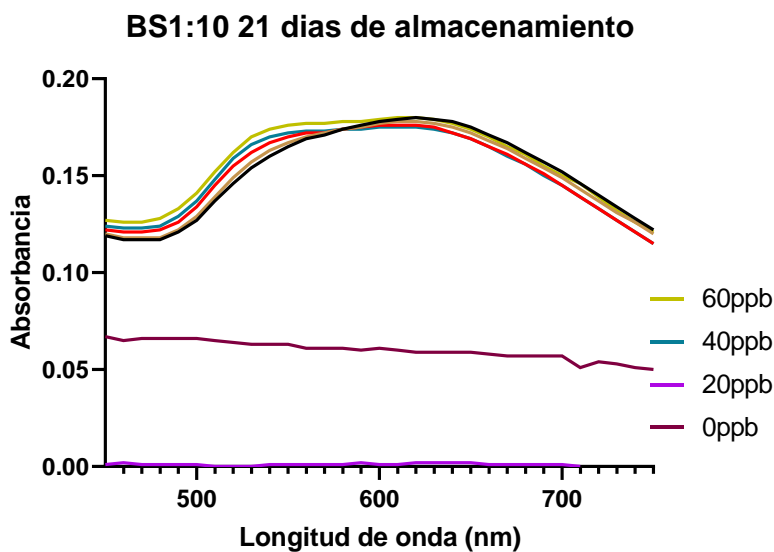


Figura 22. **Espectro de absorbancia para el aptasensor 1:10 posterior a 21 días desde su preparación.** Se observa el espectro el comportamiento óptico del NAS 1:10 luego de 21 días desde su preparación para evaluar condiciones de estabilidad para continuar con los ensayos de colorimetría en presencia de 20 ppb, 40 ppb y 60 ppb. de Clorpirifós.

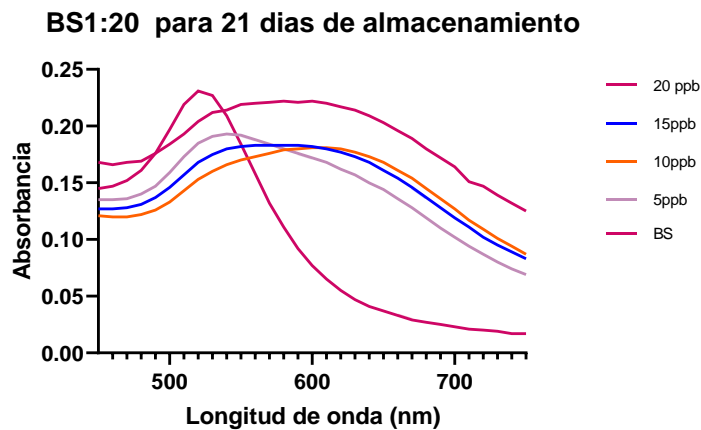


Figura 23. **Espectro de absorbancia para el aptasensor 1:20 posterior a 21 días desde su preparación.** Se observa el espectro el comportamiento óptico del NAS 1:20 luego de 21 días desde su preparación para evaluar condiciones de estabilidad en presencia de 5 ppb, 15 ppb y 20 ppb. de Clorpirifós

Influencia de la degradación del Clorpirifos en la detección analítica utilizando biosensores: revisión del estado actual y aspectos futuros¹

Influence of Chlorpyrifos degradation on analytical detection using biosensors: current status review and future aspects

M. Torres, K. Pozo y V. Díaz

Recibido: enero 22 de 2021 - Aceptado: septiembre 22 de 2021

Resumen— El Clorpirifos (CP) es un pesticida ampliamente utilizado, relacionado a diversos daños en salud y dado a su ubicuidad, su monitoreo ha adquirido relevancia para evaluar el estado y tasas de descarga al medioambiente. Por su parte, los factores ambientales favorecen la degradación de CP y disipación en el medio ambiente, dificultando su trazabilidad y detección real en las diversas matrices. En la actualidad, el uso de biosensores proporciona técnicas analíticas prometedoras para la detección de diversos compuestos de importancia ambiental, pero se desconoce si la degradación natural de dichos compuestos afectaría el correcto reconocimiento por parte de los biosensores, influyendo en su uso como herramienta de trazabilidad. El objetivo principal de esta revisión es abarcar los recientes avances de biosensores para la detección de CP, sus desafíos en la detección en muestras reales asociados a la degradación de este contaminante y los aspectos futuros asociados al monitoreo ambiental de este pesticida relacionado con riesgos para la salud.

Palabras clave— Degradación, Elementos de reconocimiento biológico, Metabolitos, Monitoreo Ambiental, Trazabilidad, aptámero.

Abstract— Chlorpyrifos (CP) is a widely used pesticide related to various health hazards, and for its ubiquity, its monitoring has become relevant to assess the state and rates of emission to the environment. On the other hand, environmental factors favor the degradation of CP and dissipation in the environment, making it difficult to trace and detect it in the different matrices. Nowadays, the use of biosensors provides promising analytical techniques for the detection of various environmental importance compounds. However, it is unknown if the natural degradation of these compounds would affect the correct recognition by biosensors, influencing their use as a traceability tool. The main objective of this review is to address the recent advances in biosensors for the detection of CP, its challenges in detecting the real sample associated with the degradation of this pollutant, and the future aspects about with the environmental monitoring of this pesticide related to health risks.

Keywords— Degradation, Biological Recognition Elements, Metabolites, Environmental Monitoring, Traceability, Aptamer.

¹Producto derivado del proyecto de investigación "Investigación y desarrollo de aptasensores nanofísicos para la cuantificación ultrasensible de contaminantes orgánicos persistentes en matrices acuosas medioambientales".

M. Torres, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, email: mtorresg@correo.usb.cl

K. Pozo, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, karla.pozo@usb.cl

V. Díaz, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, email: victor.diazg@usb.cl

Como citar este artículo: Torres, M., Pozo, K. y Díaz, V. Influencia de la degradación del Clorpirifos en la detección analítica utilizando biosensores: revisión del estado actual y aspectos futuros, *Entre Ciencia e Ingeniería*, vol. 15, no. 30, pp. 9-21, julio-diciembre 2021.

DOI: <https://doi.org/10.31908/19098367.2102>



Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterasa
ADI	Ingesta diaria aceptable
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de Plata
ARN	Ácido ribonucleico
Au	Oro
AuNR	Nanorods de oro
AuNSs	Nano esferas de Oro
BChE	Butirilcolinesterasa
BDD	Diamante dopado con boro
BSA	Albumina de suero bovino
BZE-DADDO	Benzoilecgonina-1,8-diamino-3,4-dioxetano
ChpA	Activación de transcripción
ChpR	Regulador de transcripción
cFLISA	Ensayo inmunoabsorbente unido a fluorescencia
CHIT	Quitosano
CdTe	El telururo de cadmio
CGE	Electrodo de carbono vítreo
COPs	Compuestos Orgánicos Persistentes
CP	Clorpirifos
CPO	Clorpirifos oxón
CS	Esfera de Carbono